

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

ANÁLISIS QUÍMICO DEL ANTIBIÓTICO PRODUCIDO POR *Bacillus megaterium*
AISLADO DE MUESTRAS DE SUELO, MEDIANTE CROMATOGRAFÍA Y
TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS.

AUTOR:

DIEGO ALEXANDER GUZMÁN FLOR

TUTORA:

MARÍA ELENA MALDONADO RODRÍGUEZ

Quito, noviembre del 2018

Cesión de derechos de autor

Yo, Diego Alexander Guzmán Flor, con documento de identificación N° 1716089576, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación intitulado: “Análisis químico del antibiótico producido por *Bacillus megaterium* aislado de muestras de suelo, mediante cromatografía y técnicas espectroscópicas”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

(Firma)



.....

Diego Alexander Guzmán Flor

CI:1716089576

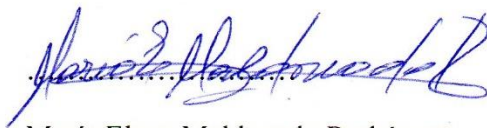
Quito, noviembre de 2018

Declaratoria de coautoría del docente tutor/a

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, “Análisis químico del antibiótico producido por *Bacillus megaterium* aislado de muestras de suelo, mediante cromatografía y técnicas espectroscópicas” realizado por Diego Alexander Guzmán Flor, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, Noviembre del 2018

(Firma)



María Elena Maldonado Rodríguez

CI: 1707743157

Dedicatoria

Con un aprecio muy especial a mi madre Patricia Flor, quien por su amor, su apoyo incondicional, sus palabras de alientos y sus ánimos a lo largo de mi vida han permitido que siga adelante y culmine una de las muchas metas planteadas en mi vida. A su vez, a mi padre Luis Guzmán, quien me enseñó a salir adelante a pesar de que tan complicadas sean las situaciones saber afrontarlas y buscar una solución; y sobre todo por su apoyo económico para poder terminar mis estudios sin ningún inconveniente. A mis hermanos Andrés y Fernando, que estuvieron hasta el final apoyándome y dándome fuerzas para convertirme en un excelente profesional.

Va por ustedes, ya que admiro en lo que me han convertido y gracias a ello, hoy puedo ver cumplido este logro.

Cada fracaso enseña al hombre algo que necesitaba aprender. Charles Dickens.

Diego Alexander Guzmán Flor

Agradecimientos

En primer lugar, a la Universidad Politécnica Salesiana por haberme brindado los valores primordiales para poder convertirme en un profesional de calidad. A su vez, a los docentes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales por impartirme sus conocimientos, sus anécdotas, sus consejos con la finalidad de ser un profesional de bien y superarme durante el resto de mi vida.

A mi tutora, PhD. María Elena Maldonado por haberme ofrecido la oportunidad y confianza de colaborar en el Grupo de Investigación BIOARN y de ese modo fortalecer mis conocimientos al trabajar junto a ella. Además, por transmitir sus consejos, su paciencia y su apoyo durante el desarrollo del trabajo de titulación.

Al laboratorio de Ciencias de la Vida por permitirme el uso de las diferentes instalaciones y de sus equipos. De igual manera, a todo el personal por facilitar el trabajo en el laboratorio; especialmente a MSc. Carina Hidalgo por aportar con sus conocimientos en la investigación y al Ing. Marco Ibarra por su colaboración constante, sus consejos en el trayecto del proyecto y por convertirse en un gran amigo.

A los profesores PhD. Paco Noriega y al MSc. Daniel Acurio que han brindado grandes aportes en la interpretación de los resultados de la investigación realizada; conjuntamente mi gratitud a Esteban Rojas por su inmensa ayuda desde el inicio del proyecto.

A todos mis amigos, en especial a Dominic Valencia, Marco Zambrano, Gina Jami, Evelin Masache, Johana Meneses, Mariana Cobos y Karen Castillo, por haber estado en toda mi etapa universitaria, por su ayuda y su amistad incondicional siempre llevaré conmigo los mejores momentos.

Índice de Contenido

Introducción	1
1. Marco conceptual	4
1.1. Microorganismos	4
1.2. Bacterias del suelo	5
1.2.1. Género <i>Bacillus</i>	5
1.3. Antibióticos	7
1.3.1. Clasificación de los antibióticos	7
1.4. Resistencia Bacteriana	10
1.5. Producción de antibióticos	11
1.6. Purificación del antibiótico	12
1.7. Separación analítica	12
1.7.1. Extracción líquido-líquido	13
1.7.2. Cromatografía	14
1.8. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana	17
1.8.1. Método de dilución en agar	18
1.8.2. Método de dilución en caldo	18
1.8.3. Método de microdilución en caldo	18
1.9. Bioautografía	20

1.9.1.	Tipos de Bioautografía.....	20
1.10.	Técnicas espectroscópicas	21
1.10.1.	Espectroscopía Infrarroja	22
1.11.	Diseño Completamente al Azar (DCA)	23
1.12.	Análisis de Varianza (ANOVA)	23
1.13.	Prueba de rangos múltiples de Duncan	24
2.	Metodología	25
2.1.	Obtención de la cepa	25
2.2.	Reactivación de la cepa	26
2.3.	Preparación del inóculo del Biorreactor	26
2.3.1.	Preparación del medio ISP2	26
2.3.2.	Elaboración del preinóculo	27
2.4.	Obtención del antibiótico	28
2.4.1.	Eliminación de la biomasa	29
2.4.2.	Extracción del antibiótico	29
2.5.	Análisis del antibiótico extraído	30
2.5.1.	Análisis mediante espectroscopía infrarroja (IR).....	30
2.5.2.	Purificación del compuesto por cromatografía en capa fina (TLC).....	32
2.5.3.	Bioautografía.....	34
2.5.4.	Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	37

2.5.4.1. Análisis estadístico	41
3. Resultados y Discusión.....	43
3.1. Obtención del antibiótico	43
3.1.1. Espectroscopía Infrarroja (IR).....	44
3.1.2. Cromatografía en capa fina	45
3.1.3. Bioautografía.....	47
3.1.4. Evaluación de la MIC.....	47
3.1.5. Análisis estadístico de la MIC	49
Conclusiones	55
Recomendaciones.....	57
Referencias	58
Anexos	68

Índice de tablas

Tabla No.1. Principales familias de antibióticos según su estructura	8
Tabla No.2. Métodos de separación	13
Tabla No.3. Diseño de la microplaca con las concentraciones de los antibióticos utilizados en µg/mL.	40
Tabla No. 4. Cantidad de antibiótico obtenido del medio ISP2 mediante la extracción con hexano.	44
Tabla No. 5. Lectura de absorbancias de la MIC obtenidas mediante el equipo Microplate Reader	49
Tabla No. 6. ANOVA para los tratamientos de la inhibición de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	50
Tabla No.7: ANOVA para los tratamientos de la inhibición de <i>Bacillus spizizenii</i>	51
Tabla No.8. ANOVA de la inhibición de las cepas utilizadas en el ensayo.	53

Índice de figuras

Figura No. 1: Productos obtenidos a partir de microorganismos.	4
Figura No. 2: Principales grupos de acción con su respectivo sitio.	10
Figura No.3: Proceso de la extracción líquido-líquido.	14
Figura No.4: Material utilizado en la cromatografía en capa fina	15
Figura No.5: Preparación de la microdilución en caldo	19
Figura No.6: Reducción de la sal de tetrazolio por la deshidrogenasa.	21
Figura No.7: Regiones de todo el espectro electromagnético.	22
Figura No.8: Cepa conservada en Cryobank.	25
Figura No.9: Diagrama de la reactivación de la cepa PAP48G3.	26
Figura No.10: Biorreactor con medio esterilizado.	27
Figura No.11: Diagrama del proceso de inoculación.	28
Figura No.12: Diagrama del proceso de eliminación de biomasa.	29
Figura No.13: Diagrama del proceso de extracción del antibiótico.	30
Figura No.14: Diagrama del proceso de purificación del antibiótico.	31
Figura No.15: Diagrama del proceso del análisis del antibiótico en la espectroscopía IR.	32
Figura No.16: Diagrama del proceso para realización de la cromatografía.	34
Figura No.17: Diagrama de la estandarización del inóculo	36
Figura No.18: Diagrama del proceso de la Bioautografía.	37
Figura No. 19: Diseño de la bandeja de microdilución.	39
Figura No.20: Diagrama de la coloración y lectura de la microplaca	41

Figura No. 21: Pruebas Duncan 5 % para concentraciones de antibiótico frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i>	51
Figura No.22: Pruebas Duncan 5 % para concentraciones de antibiótico frente a <i>Bacillus spizizenii</i>	52
Figura No.23: Porcentaje de inhibición de <i>Pseudomona aeruginosa</i> (P.a.) y <i>Bacillus spizizenii</i> (B.s.) frente al antibiótico extraído, pruebas Duncan 5%.	54

Índice de anexos

Anexo No.1. Antibiótico producido por <i>Bacillus megaterium</i> en medio ISP2 y extraído con hexano, en un tiempo de producción de 3 días y de 4 días.	68
Anexo No. 2. Espectros Infrarrojos del Antibiótico purificado.....	69
Anexo No. 3. Cromatografía TLC utilizando antibiótico a una concentración de 10 mg/mL observadas bajo luz UV a 254 nm (absorbancia), a 365 nm (fluorescencia) y con revelador de vainillina/Ácido Sulfúrico.	71
Anexo No.4. Medición de los <i>R_f</i> de las moléculas obtenidas en la separación mediante TLC.	72
Anexo No. 5. Bioautografía del antibiótico utilizado en una concentración de 10 mg/mL contra <i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 9027) y <i>Bacillus spizizenii</i> (ATCC 6633).	72
Anexo No. 6. Microdilución en caldo para evaluar la Concentración Mínima Inhibitoria.	73

Resumen

Resistencia bacteriana es uno de los problemas de la salud pública a nivel mundial, ya que la mayoría de los antibióticos existentes ya no son efectivos contra las enfermedades bacterianas. Por tal motivo, muchos microorganismos de diversos ambientes han sido aislados y sometidos en condiciones de estrés para obtener metabolitos secundarios y de tal manera aislar y la caracterizar químicamente nuevos compuestos bioactivos que sean útiles en la Industria farmacéutica.

Dentro de la investigación se ejecutó la producción del antibiótico utilizando un biorreactor, inoculando la cepa bacteriana identificada como *Bacillus megaterium* (PAP48G3); obteniendo en la producción de 3 días una cantidad de 45.1 mg y en 4 días un total de 52.2 mg. Una vez obtenido el antibiótico se realizó la espectroscopía IR, el cual permitió identificar los principales grupos funcionales del antibiótico, tales como: amino (N-H), hidroxilo (O-H), carbonilo (C=O), alcano, Alcoxi (éter). Además, se realizó una purificación mediante cromatografía en capa fina, en el cual la mejor separación de moléculas se obtuvo con la fase móvil compuesta por Acetato de etilo-Cloroformo (3:1), logrando así la separación de tres compuestos bioactivos y mediante la bioautografía se identificó que el compuesto con R_f de 0.61 contiene la propiedad antibiótica contra los microorganismos patógenos seleccionados. Por último, se evaluó la concentración mínima inhibitoria (MIC) realizando la microdilución en caldo, obteniendo una inhibición en 500 $\mu\text{g/mL}$ tanto para *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027) como para *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633).

Palabras claves: antibiótico, microdilución, MIC, bioautografía.

Abstract

Bacterial resistance is one of the main issues regarding public health worldwide, since most of the existing antibiotics are no longer effective against bacterial diseases. To that end, many microorganisms from different environments have been isolated and subjected under stress conditions to obtain secondary metabolites. Consequently, new bioactive compounds are isolated and chemically typified in order to be useful on the pharmaceutical industry.

Within the research, the antibiotic was produced using a bioreactor by injecting the bacterial strain identified as *Bacillus megaterium* (PAP48G3); obtaining in the production of 3 days an amount of 45.1 mg and in 4 days a total of 52.2 mg. Once the antibiotic was obtained, IR spectroscopy was performed which allowed to identify the main antibiotic functional groups, such as: Amino (N-H), Hydroxyl (O-H), Carbonyl (C = O), Alkane, and Alkoxy (ether). In addition, purification was carried out by thin layer chromatography, in which the best separation of molecules was obtained with the mobile phase composed of Ethyl Acetate-Chloroform (3:1); achieving then the separation of three bioactive compounds and through bioautography it was identified that the compound with *R_f* of 0.61 contains the antibiotic property against the selected pathogenic microorganisms. Finally, the minimum inhibitory concentration (MIC) was evaluated by performing microdilution in broth, obtaining an inhibition in 500 µg / mL for *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027) and *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633).

Keywords: antibiotic, microdilution, MIC, bioautography.

Introducción

El suelo cumple un papel fundamental en la obtención de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Muñoz (2017), menciona que el 99 % de las bacterias del suelo podrían beneficiar a la población con novedosos antibióticos. Tomando en cuenta la enorme diversidad de especies de *Bacillus*, es de alta importancia aislar y resguardar las cepas que produzcan agentes antimicrobianos, seguido de la respectiva caracterización (Baindara, et. al, 2013).

“Los antibióticos son sustancias químicas producidas por organismos vivos (generalmente microorganismos) o derivados de estas sustancias que suprimen el crecimiento o eliminan otros microorganismos en bajas concentraciones” (Choma, 2013, p.417). El descubrimiento de las sustancias antimicrobianas fue beneficioso en el campo de la medicina, ya que finalmente parecía haber predominado contra las enfermedades bacterianas. No obstante, se produjeron consecuencias por el uso de estas sustancias. La primera fue que los antibióticos estaban relacionados con efectos secundarios tóxicos como las alergias; la segunda por la fácil adaptación de los microorganismos a medios hostiles y la facilidad de la transmisión de la información, entre las células bacterianas (Choma, 2013).

La resistencia microbiana está relacionada con el uso de los antibióticos, mismos que se utilizan en los tratamientos de enfermedades de humanos, animales y en plantas. Además, su uso en el campo agrícola permite el desarrollo del ganado, produciendo residuos y de esta manera la resistencia (Williams, et al., 2016). Por lo tanto, se asume que al menos el 50 % de los antibióticos no son totalmente efectivos para el control de enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention, 2013). Uno de los retos más importantes

para la salud pública es superar la resistencia a los medicamentos antimicrobianos (Uzaira, et al., 2017). Hasta el momento, muchos antibióticos se han utilizado para tratamiento de enfermedades infecciosas, por tal motivo se continúa investigando nuevos metabolitos, ya que la resistencia de los antibióticos está en incremento (Andayani, et al., 2016). A nivel mundial existen una gran variedad de cepas productoras de antibióticos que han sido aisladas del suelo, de océanos y de ambientes variables; y al realizar el respectivo estudio de las condiciones fisiológicas del microorganismo seleccionado han brindado buen rendimiento en la producción de sustancias antimicrobianas (Uzcátegu & Serrano, 2013).

Las técnicas analíticas son importantes para clasificar e identificar el metabolito secundario tomando en cuenta la similitud química con un antibiótico. Entre las técnicas tenemos la cromatografía en capa fina que ayuda a separar las fracciones del antibiótico; ya que el eluyente desplaza los componentes que constituyen la muestra que se encuentra en la fase estacionaria, para luego aislar con exactitud la molécula bioactiva mediante la bioautografía (Dewanjee, et al., 2015; Sánchez, 2010). Otra técnica utilizada es la espectroscopía infrarroja (IR), es de gran uso en los medicamentos ya que permite identificar los principales grupos funcionales de una sustancia. Además, el espectro IR es característico de una sustancia por lo cual permite identificar un compuesto desconocido por comparación con estándares (Volontè & Quiroga, 2013). Por último, la técnica de microdilución en caldo se “utiliza para medir cuantitativamente la actividad *In Vitro* de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano” (Malbrán, 2012, p. 2), y de tal manera evaluar la concentración mínima inhibitoria (MIC).

La presente investigación se fundamenta en los resultados definidos en el trabajo experimental “Identificación de microorganismos de suelos de la provincia de Pichincha,

con capacidad de producir antibióticos de amplio espectro” elaborado por Núñez & Sierra (2018). El microorganismo aislado a partir de muestras del suelo e identificado mediante Kit comercial como *Bacillus megaterium*, produjo antibiosis frente a *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633) y contra *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027), en las condiciones ideales de estrés siguientes: concentración del 1.2 % de NaCl y pH de 7 ± 0.2 en el medio ISP2, el cual es un medio apropiado para microorganismos productores de antibiótico. Para la producción se utilizará un biorreactor para obtener una mayor cantidad del metabolito secundario para sus respectivos análisis. Se realizará la purificación de la mezcla mediante cromatografía en capa fina y se determinará los principales grupos funcionales de la molécula con propiedades antimicrobianas con ayuda de la espectroscopía FT-IR. Finalmente se evaluará la concentración mínima inhibitoria (MIC) del antibiótico mediante la técnica de microdilución en caldo.

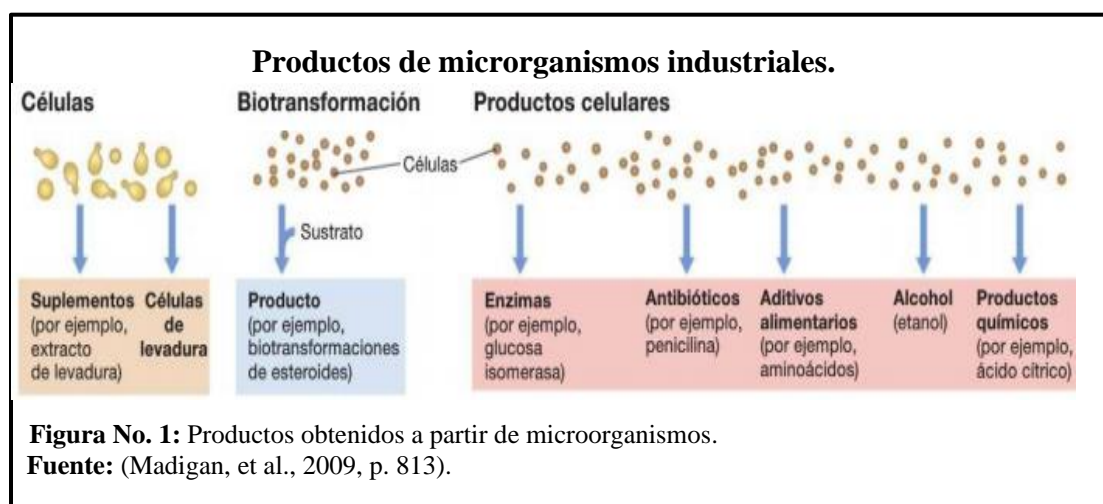
Capítulo 1

1. Marco conceptual

1.1. Microorganismos

Los microorganismos son los individuos más antiguos y abundantes que existen en el mundo, se encuentran en todo tipo de ambiente e interactúan con los ecosistemas. Además, son indispensables para el mantenimiento de la vida, ya que participan en procesos metabólicos, ecológicos y biotecnológicos de gran importancia para la industria: farmacéutica, alimenticia, médica, etc (Egas & Tinajero, 2016).

En la industria los microorganismos tienen como objetivo producir metabolitos capaces de sintetizar uno o más productos de gran utilidad para el ser humano. Un microorganismo debe ser rentable al producir una sustancia de interés a gran escala; de igual forma, debe crecer y elaborar el producto en un ciclo corto mediante el uso de un cultivo barato. También, los microbios no deben ser patógenos para los seres vivos, ya que al aumentar la densidad celular es imposible evitar la contaminación del medio externo. En la figura No.1 se indican los productos que la industria puede obtener a partir de los microorganismos (Madigan, et al., 2009).



Una gran cantidad de cepas productoras de metabolitos secundarios han sido aislados de muestras de suelo, océanos y ambientes variables con diversidad de microorganismos (Uzcátegu & Serrano, 2013).

1.2.Bacterias del suelo

El suelo cumple un papel fundamental en la obtención de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Muñoz (2017), menciona que el 99 % de las bacterias del suelo podrían beneficiar a la población con novedosos antibióticos. Tomando en cuenta la enorme diversidad de especies del género *Bacillus*, es de suma importancia aislar y resguardar las cepas que produzcan agentes antimicrobianos, seguido de la respectiva caracterización (Baindara, et al., 2013).

1.2.1. Género *Bacillus*

Este género posee una morfología de bordes irregulares, aplanados, de color blanco mate, y es brillante con un aspecto ya sea harinoso o cremoso. El género *Bacillus* es principalmente utilizado como agente de control biológico, se encuentran en diversos lugares tales como: suelo, aire, tierra, etc (Larrea & Falconí, 2015).

Las cepas de *Bacillus* producen péptidos antimicrobianos, los cuales incluyen diversos tipos de bacteriocinas y tensioactivos surfactantes antimicrobianos como lipopéptidos y glucopéptidos cíclicos sin ribosomas. Los lipopéptidos de los *Bacillus* se dividen en tres grupos importantes que son la iturina, la surfactina y la fengicina. De estos lipopéptidos, las iturinas son ampliamente producidas por la especie *B. subtilis* y *B. cereus*. Tanto la surfactina como la iturina son producidas por enzimas multifuncionales codificadas por diversos grupos de genes (Baindara, et al., 2013).

1.2.1.1. Especie *Bacillus megaterium*

La especie *Bacillus megaterium* es una bacteria formadora de esporas que se encuentra en diversos hábitats, tales como: el suelo, los sedimentos, el agua de mar, los alimentos secos, entre otros. Se caracteriza por ser la bacteria de mayor tamaño comparado con las otras especies de bacilo, teniendo una dimensión de 1.5 por 4 μm . Además, su fácil crecimiento en medios de cultivo económicos, y la ausencia de proteasas alcalinas y endotoxinas, hacen de este microorganismo un excelente productor biotecnológico (Putkaradze, et al., 2017; Scholle, et al., 2003).

Esta bacteria tiene diversas aplicaciones a nivel industrial como la elaboración de ácido polihidroxibutírico, que es un polímero orgánico utilizado como termoplástico biodegradable. También, la bacteria es aplicada como control biológico de enfermedades en plantas de té y ayuda en la degradación de plaguicidas organofosforados, dicloroanilinas y otros cargamentos peligrosos. *Bacillus megaterium* disminuye la toxicidad de ciertos metales pesados como en el caso de Cr (VI) en Cr (III) (You, et al., 2018), Tortoló (2015), menciona que *Bacillus megaterium* es el principal fabricante de vitamina B12, ya que posee la propiedad natural de producirla tanto en presencia como en ausencia del oxígeno. Este microorganismo se ha mejorado mediante la biotecnología para obtener un mayor rendimiento de vitamina B12. Cabe destacar que se han realizado estudios sobre la propiedad antimicrobiana que posee esta bacteria, tal es el caso de la investigación (Núñez & Sierra, 2018, p. 45), quienes concluyen que:

Bacillus megaterium produce una mayor actividad antimicrobiana contra *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633) en el día 4 en condiciones de estrés de pH 7 y 1.2 % de salinidad. Contra *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027), la bacteria produjo

mayor actividad antimicrobiana en el día 3 en condiciones de estrés de pH 7 y 1.2 % de salinidad.

1.3. Antibióticos

La terminología de antibiótico proviene de: “anti” que significa <<en contra >> y “bios”, <<vida>>, es decir “contra la vida”. El uso de los antibióticos se dio a partir del descubrimiento de la penicilina, y desde ese momento se ha reducido la mortalidad por enfermedades infecciosas (Cabrerizo, 2016).

Los antibióticos son sustancias químicas con propiedades antimicrobianas producidas por microorganismos o fabricados mediante síntesis. Estos metabolitos pueden impedir el crecimiento de otras bacterias e incluso matarlas (Paredes et al., 2004; Talero et al., 2014). Se producen por fermentación, este proceso demora pocos días en producir una cantidad extraíble del metabolito de interés (Najafpour, 2017).

1.3.1. Clasificación de los antibióticos

Los antibióticos se pueden agrupar tomando en cuenta diferentes criterios:

1.3.1.1. Según su origen

Según Paredes, et al. (2004, p. 116), el origen de los antibióticos puede ser:

- **Natural o biológico.** Se obtiene de cultivos de microorganismos que pueden ser hongos o bacterias.
- **Semisintético.** A partir de un núcleo básico de un agente obtenido de forma natural, se modifican algunas de sus características químicas, para mejorar sus propiedades. Por ejemplo, aumentar su actividad, ampliar su espectro de acción, facilitar su administración o disminuir los efectos indeseables.

1.3.1.2. Según su estructura química

Esta clasificación se basa en la similitud de las estructuras químicas de ciertos antibióticos, las cuales les permiten obtener características fisicoquímicas y farmacológicas similares (Aristil, 2010). En la tabla No.1 se indican las familias de antibióticos con similitud en la estructura.

Tabla No.1. Principales familias de antibióticos según su estructura

Familias	Antibióticos
Beta-Lactámicos.	Penicilina y derivados, cefalosporinas, cefamandinas, carbapenem, monobactámicos, inhibidores de las betalactamasas.
Aminoaciclítos.	Espectinomicina, gentamicina, amikacina, neomicina, kanamicina, etc.
Tetraciclinas.	Oxitetraciclina, doxiciclina.
Macrólidos.	Eritromicina/nuevos macrólidos: claritromicina, roxytromicina, azitromicina (azálido)
Sulfonamidas.	Sulfametoxazoles, sulfisoxazole.
Quinolonas.	Ácido nalidíxico, pipemídico/quinolonas fluoradas: pefloxacin, ciprofloxacino, norfloxacina, sparfloxacin.
Derivados Nitroimidazólicos.	Metronidazol, tinidazol, ornidazol.
Polimixinas.	Polimixina B y E.
Nitrofurantoína.	
Rifampicina.	

Nota: Tomado de *Antibióticos, bases microbiológicas del uso de antimicrobianos* (Quintana, 2002, p. 3).

1.3.1.3. Según su efecto de acción

La acción de los antibióticos puede ser bactericida, en otras palabras, provocan la muerte de las bacterias de un modo directo; y puede ser bacteriostática, impidiendo el crecimiento del microorganismo (Guillamas, et. al, 2017).

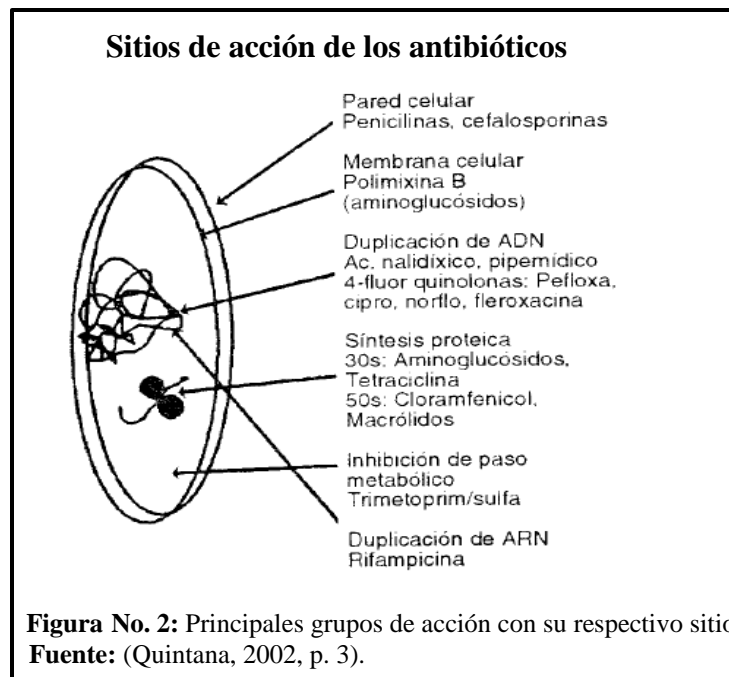
1.3.1.4. Según su espectro de actividad

Cada antibiótico se mide por medio del espectro bacteriano, esto se refiere a la acción que posee cada sustancia microbiana frente a diferentes microorganismos, y pueden ser:

- **Amplio espectro:** el fármaco produce alta efectividad ante muchos organismos, por ejemplo, las tetraciclinas y cloranfenicol.
- **Medio espectro:** actúa en ciertos gérmenes, tal es el caso de la penicilina que ataca: a cocos gramnegativos y grampositivos, espiroquetas y bacterias grampositivas.
- **Corto espectro:** que solamente es efectivo para unos microbios, se puede citar la dicloxacilina que interviene contra *Staphylococcus epidermidis* sensibles (Aristil, 2010; Guillamas, et. al, 2017).

1.3.1.5. Según su mecanismo de acción

“Los antibióticos pueden clasificarse de acuerdo con el sitio blanco de acción que tienen y el tipo de efecto metabólico que producen en la célula bacteriana” (Quintana, 2002, p. 3). En la figura No.2 se pueden observar los principales grupos.



1.4.Resistencia Bacteriana

Es la habilidad con la cual un microorganismo logra resistir a los efectos de un antibiótico, se considera a nivel mundial como un problema de gran importancia en la salud pública. Las principales causas que producen la resistencia son: el uso indebido de los antimicrobianos, el aumento de la pobreza, el costo de los servicios, la venta sin control de los fármacos en las farmacias, etc. (Action on Antibiotic Resistance (ReAct), 2014; Calderón & Aguilar, 2016).

La resistencia se produce cuando en una población de bacterias solo sobreviven un pequeño grupo de estas, el cual continua con el desarrollo en concentraciones de antibióticos que inhiben el crecimiento de tal microorganismo. Por lo tanto, estas bacterias mutantes que han resistido dan origen a un nuevo consorcio de microbios con resistencia adquirida del antimicrobiano utilizado. Este aumento descontrolado de cepas resistentes

ha incentivado el descubrimiento de nuevos antibióticos para combatir la resistencia y estimular el uso racional en el campo de la salud y la población (Arco, 2014).

Según Calderón & Aguilar (2016, pp. 759-760), destacan que entre los mecanismos de defensa que han desarrollado las bacterias contra los antibióticos se encuentran:

- Bombas de eflujo o expulsión del antibiótico del interior de la célula bacteriana; eliminan el metabolito al exterior de la célula sin producir modificaciones.
- Modificación o inactivación del antibiótico mediante enzimas hidrolíticas; entre las enzimas más importantes están las betalactamasas que inactivan el antimicrobiano.
- Bloqueo de la penetración del antibiótico mediante modificación del sitio activo.
- Alteración o disminución de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana.
- Biofilmes, formados por las bacterias y permite protegerla de diversas amenazas en especial de la acción de los antibióticos.
- Sobreexpresión del sitio blanco, la duplicación génica a las mutaciones de los promotores de la transcripción de estos genes, son el mecanismo responsable.

1.5.Producción de antibióticos

Los antibióticos se obtienen mediante proceso de fermentación, según Hernández (2003, p. 38) la define como “proceso donde los microorganismos producen metabolitos o biomasa, a partir de sustancias orgánicas, en ausencia o presencia de oxígeno. La descomposición de sustratos es llevada a cabo por enzimas producidas por los microorganismos para tal finalidad”

Esta fermentación se puede realizar en biorreactores y tarda pocos días en producir suficiente producto para su extracción. El oxígeno es el factor primordial en la producción; por lo tanto, se utiliza una cierta cantidad de azúcar y varias proteínas poliméricas para perfeccionar la producción. Para comprobar la cantidad del antimicrobiano se realiza bioensayos para observar la inhibición que produce el caldo de cultivo fermentado (Hernández, 2003; Najafpour, 2017).

1.6.Purificación del antibiótico

La purificación de los antibióticos utilizando métodos de extracción suele ser muy complicada. Si el antibiótico es soluble en un disolvente orgánico, puede ser relativamente fácil purificarlo por extracción utilizando un volumen pequeño de disolvente. Pero si, por el contrario, el antibiótico no es soluble en un disolvente, deberá separarse del medio líquido de fermentación ya sea por adsorción, intercambio iónico o precipitación química. El objetivo de dichos métodos es conseguir un producto cristalino de pureza elevada (Madigan, et. al., 2009, p. 820).

1.7.Separación analítica

Las separaciones son de gran importancia en la industria química, biomédica y para análisis químicos. Esta técnica tiene como propósito descartar o disminuir las interferencias para conseguir información analítica cuantitativa e identificar los componentes de una mezcla específica. La separación puede ser:

- **Completa:** las moléculas de la mezcla se separan totalmente y ocupan una región espacial diferente.

- **Parcial:** esto se refiere que se aísla un compuesto específico de toda una mezcla (Skoog & West, 2014, pp. 847-848).

En la tabla No.2 se enlistan los diferentes métodos de separación

Tabla No.2. Métodos de separación

Método	Fundamento del método
1. Separación de fases mecánica. a. Precipitación y filtración. b. Destilación. c. Extracción. d. Intercambio iónico.	a. Diferencia de solubilidad entre los compuestos formados. b. Diferencia de volatilidad entre los compuestos. c. Diferencia de solubilidad en dos líquidos inmiscibles. d. Diferencia en interacción de los reactivos con una resina de intercambio iónico.
2. Cromatografía.	Diferencia en la velocidad de movimiento de un soluto a través de una fase estacionaria.
3. Electroforesis.	Diferencia en la velocidad de migración de especies químicas con carga eléctrica en un campo eléctrico.
4. Fraccionamiento en campos de flujo.	Diferencia en la interacción con un campo o gradiente aplicado de manera perpendicular a la dirección de transporte.

Nota. Tomado de *Fundamentos de Química analítica* (Skoog & West, 2014, p. 849)

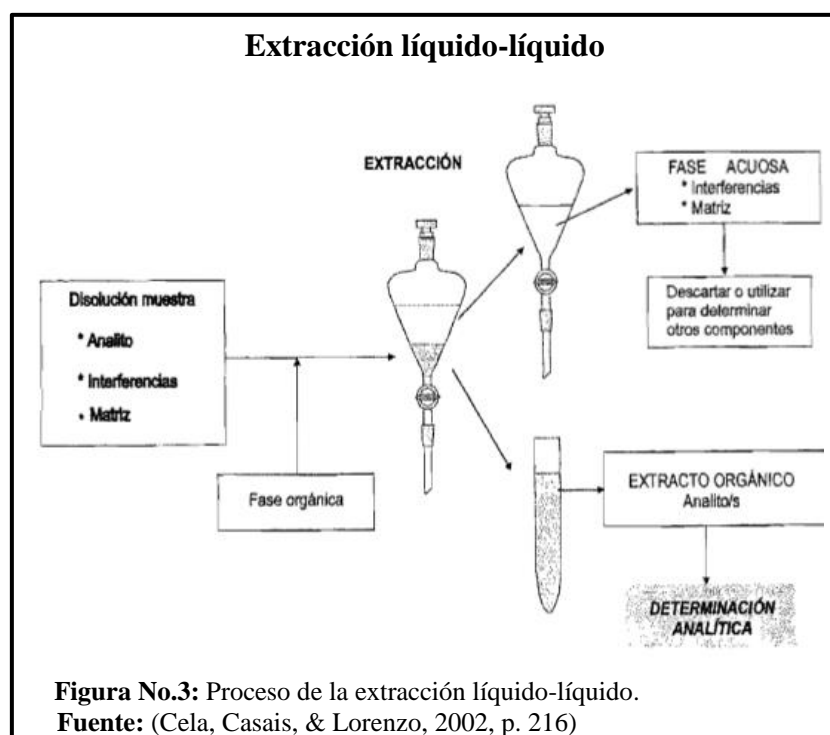
1.7.1. Extracción líquido-líquido

Los autores lo definen como:

La técnica más utilizada para la extracción de analitos de muestras acuosas. El fundamento se basa en la distribución de la muestra entre dos fases inmiscibles en

las cuales el analito y la matriz tienen solubilidades diferentes. En la mayoría de los casos, una de las fases es un medio acuoso y la otra un disolvente orgánico. Esta técnica permite llevar a cabo extracciones rápidas y es generalmente aplicable tanto a separaciones de trazas como de macrocomponentes (Cela, et al., 2002, p.206).

Otros autores mencionan que la extracción necesita 3 pasos específicos, estos son: “(1.) contacto de la disolución líquida original con el disolvente; (2.) la separación de las fases líquidas formadas por el extracto y el refinado; (3.) la recuperación del disolvente utilizado en el proceso” (Rivera & Hansen, 2017, p. 23). En la figura No.3 se observa el proceso de extracción líquido-líquido.



1.7.2. Cromatografía

La cromatografía es una técnica analítica que permite separar, identificar y cuantificar los elementos que conforman un compuesto (muestra), incluso cuando los elementos se

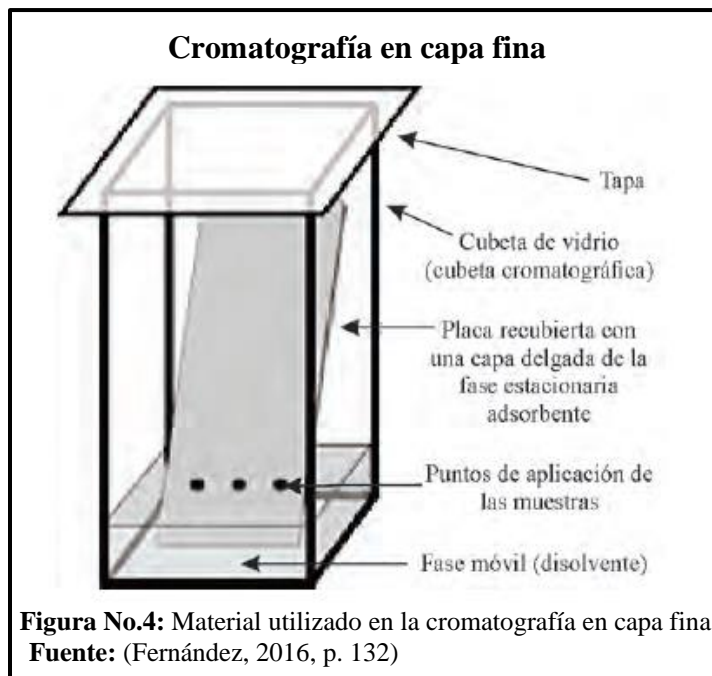
encuentren íntimamente relacionados entre sí. Los componentes que se desean separar se distribuyen entre dos fases; la primera fase que se encuentra en reposo y detiene las sustancias fuertemente denominada “fase estacionaria” y la segunda conocida como “fase móvil” que se mueve a dirección definida repartiendo la muestra lentamente por la fase estacionaria (Bermejo & Moreno, 2014).

Los métodos cromatográficos son de dos tipos básicos.

Cromatografía en columna: la fase estacionaria se mantiene dentro de un tubo delgado, y la fase móvil es forzada a través del tubo mediante presión o gravedad.

Cromatografía en capa fina: la fase estacionaria está sostenida sobre una placa plana o en los poros de un papel, y la fase móvil se mueve a través de la fase estacionaria por capilaridad o por la influencia de la gravedad (Skoog & West, 2014, p. 861).

En la figura No.4 se observa una cámara cromatográfica utilizada en la cromatografía en capa fina.



1.7.2.1. Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina (en inglés thin layer chromatography o TLC) “es una de las técnicas más utilizadas para la separación, identificación y determinación de pureza de drogas en su estado puro, o formando parte de una especialidad medicinal, drogas vegetales, fitoterápicos y/o muestras biológicas” (Volontè & Quiroga, 2013, p. 56).

En la TLC, la fase móvil es líquida (eluyente) y la fase estacionaria es sólida (sílice), en donde la fase estacionaria es polar y el eluyente es menos polar. La muestra que se va a separar debe estar disuelta en un solvente apolar y de rápida evaporación. La muestra es adsorbida por la superficie de la fase estacionaria por interacciones débiles (fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno etc.). Antes de colocar la placa se satura el ambiente de la cámara cromatográfica durante una hora con el eluyente seleccionado. Al colocar la placa por capilaridad se van separando los compuestos de la muestra produciendo “manchas”, eso quiere decir que los elementos menos polares serán arrastrados con más facilidad mientras que los polares serán retenidos por la fase estacionaria (Fernández, 2016).

1.7.2.2.Revelado de la placa

Antes del revelado de la placa primero se debe evaporar el eluyente utilizado. Existen dos métodos, y son: químicos y físicos. En los métodos químicos se rocía un reactivo facilitando una coloración en la placa; entre los reactivos químicos más utilizados para el revelado se encuentran: la Ninhidrina, el vapor de Yodo, el ácido sulfúrico, etc. En cambio, para el método físico se añade un reactivo fluorescente a la fase estacionaria o

por radiación ultravioleta o luz visible, los cuales permiten identificar las fracciones separadas (Fernández, 2016).

1.7.2.3. Análisis cualitativo y cuantitativo

La identificación de los componentes se basa en su movimiento con la ayuda de los disolventes apropiados. Esta movilidad se mide a través de los valores del “Factor de retención” (*R_f*), calculado con la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{DISTANCIA\ MIGRADA\ POR\ LA\ MANCHA}{DISTANCIA\ ENTRE\ INICIO\ Y\ FRENTE\ DEL\ DISOLVENTE}$$

Nota: Ecuación tomada de Cela, Casais, & Lorenzo (2002)

El factor de retención es un valor constante y específico de cada sustancia solo cuando las variables como temperatura, solvente, cantidad de muestra, etc., se mantienen constantes. Al ser difícil la replicación de las variables para la identificación de moléculas se utilizan compuestos que funcionan como patrones de referencia (Chen, et al., 2014).

La utilización de la técnica de revelado mediante fluorescencia bajo UV o reacciones químicas que proporcionan coloración característica, junto a los datos del *R_f* provocan una alta confiabilidad en la identificación de la sustancia. Por otro lado, la fotodensitometría es la técnica que se utiliza en la actualidad para la cuantificación de las moléculas separadas (Cela, Casais, & Lorenzo, 2002).

1.8. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana

Los métodos de dilución son los más utilizados para establecer los valores de concentración mínima inhibitoria (MIC), esto es, la concentración que impide el crecimiento de un microorganismo después de ser incubado por 24 horas; y la concentración mínima bactericida (MBC), es decir, la concentración más baja de sustancia

que impide el desarrollo de un organismo. Estos métodos estiman la posible concentración del compuesto antimicrobiano estudiado mediante el método de dilución en agar (aglutinación) o dilución en medio de cultivo (macro o microdilución). Cualquiera de los métodos de dilución permite analizar cuantitativamente la acción antimicrobiana *In vitro* contra bacterias y hongos (Balouiri, et. al. , 2016; Bustamante, 2015).

1.8.1. Método de dilución en agar

En el método de dilución en agar, se siembran el microorganismo de interés en cajas petri con una concentración específica a evaluar y se deja incubar por 18-24 h. Finalmente, se evalúa si creció o no el microorganismo (Bustamante , 2015).

1.8.2. Método de dilución en caldo

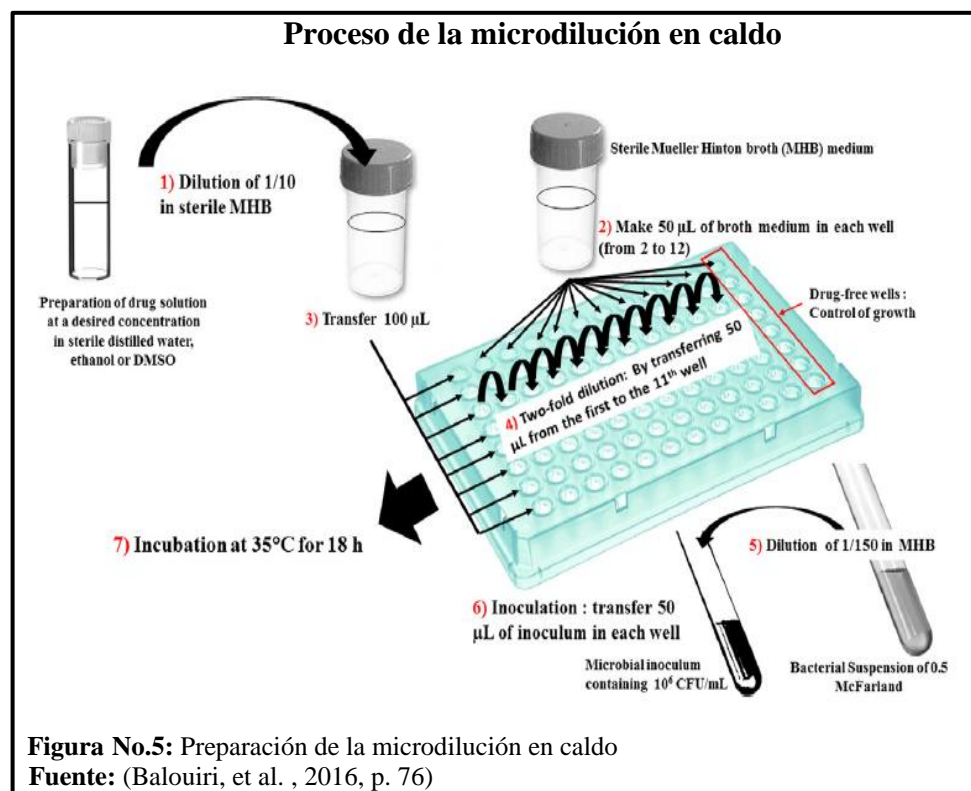
En la técnica de dilución en caldo, se utilizan micro placas (micro dilución) que contienen medio inoculado con el microorganismo en estudio y la muestra en diferentes concentraciones. La MIC es determinada después de la incubación (Bustamante, 2015).

1.8.3. Método de microdilución en caldo

La microdilución en caldo se lleva a cabo en pocillos con medios líquidos, los cuales poseen concentraciones crecientes; las placas de microdilución contienen 96 pocillos con una capacidad máxima de 500 μ L cada uno, en el cual se inocula una cantidad específica del microorganismo. Para evitar la evaporación del medio durante la incubación, las placas de microdilución deben sellarse con adhesivo. Posterior a la incubación (16-24 h. según el microorganismo), la presencia de turbidez o sedimentación indica el crecimiento del microorganismo.

Adicionalmente se coloca Bromuro de 3-(4,5 -dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium, conocido como “MTT”, como consecuencia de la actividad metabólica producida por el microorganismo reducirán el MTT produciendo cristales de color violeta; confirmando así la presencia del crecimiento microbiano (Ramírez & Castaño, 2009; Reyes & Palou, 2014).

Es una técnica útil para determinar MIC en un gran número de muestras. La ventaja sobre los métodos de difusión radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, además permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático (Ramirez & Castaño, 2009,). En la figura No.5 se describe el proceso de la microdilución en caldo.



1.9.Bioautografía

“La bioautografía es un método de detección para revelar los efectos de bioactividad de las sustancias, después de la separación cromatográfica. Esta técnica es eficiente para la identificación rápida y de bajo costo de sustancias” (Botz, 2013, p. 1).

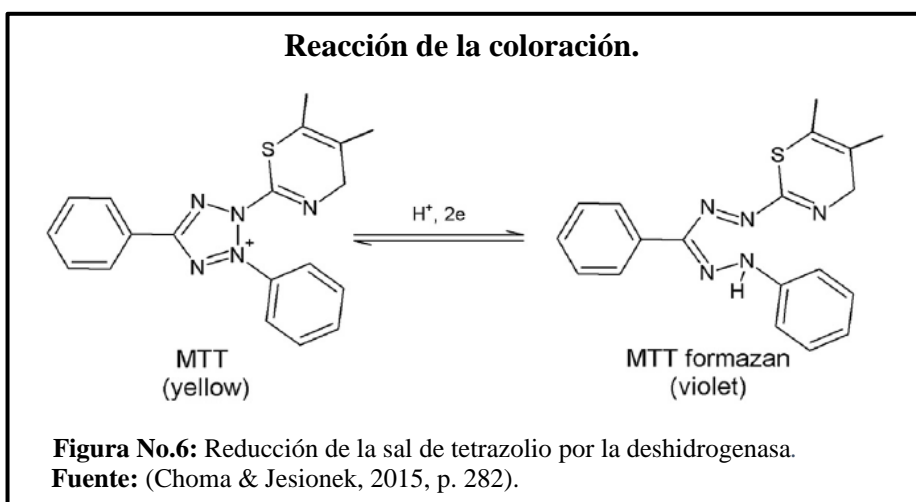
Esta técnica se utiliza para examinar cualquier efecto biológico, por ejemplo, antioxidante, enzimático, antiestrogénico, antimutagénico, antibacteriano, antimicótico, etc. No obstante, su principal utilidad es identificar las propiedades antimicrobianas o antifúngicas de los analitos en las placas cromatográficas (Choma & Jesionek, 2015).

1.9.1. Tipos de Bioautografía

Los tres métodos bioautográficos que se utilizan para detectar la actividad antimicrobiana de una mezcla de sustancias son:

- Agar difusión o bioautografía de contacto, en la cual el agente microbiano se dispersa desde una placa cromatográfica a una placa con agar. Se le coloca por un tiempo específico para la respectiva difusión.
- Detección bioautográfica directa por TLC, donde la placa se sumerge en un pequeño volumen de caldo cultivado con un microorganismo activo, se coloca en la incubadora durante un tiempo específico y los microbios crecen de manera directa sobre la capa de TLC.
- Bioautografía por inmersión, en donde la placa cromatográfica se cubre en el agar inoculado con el microorganismo de prueba (Choma & Jesionek, 2015; Dewanjee, et. al .2015).

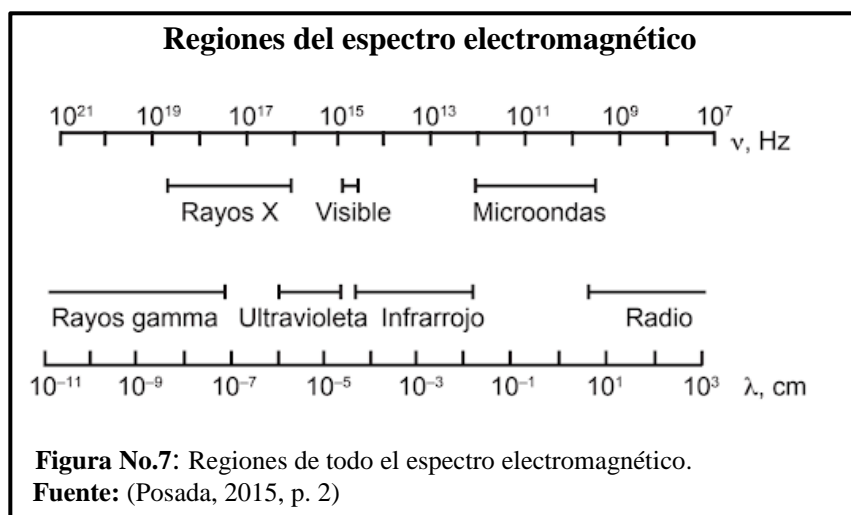
En cualquier tipo de bioautografía la visualización de los halos de inhibición se da por el uso de sales de tetrazolio, como el caso del MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). La coloración ocurre cuando las deshidrogenasas de los gérmenes transforman las sales de tetrazolio en formazan intensamente coloreado. El formazan se caracteriza por tener una coloración intensa y es el resultado de la reducción de las sales de tetrazolio causado por las enzimas de las células, se utiliza como un marcador de vitalidad. La reacción se evidencia en la figura No.6. Por tal motivo, las franjas más claras que aparecen en un fondo púrpura se deben a la actividad antimicrobiana del compuesto (Choma & Jesionek, 2015; Shneine, et al.2015).



1.10. Técnicas espectroscópicas

Las técnicas analíticas espectroscópicas tienen como fundamento calcular las interacciones de la radiación y la materia de un elemento de interés. Los métodos espectroscópicos se basan en medir la cantidad de radiación que produce o absorbe las moléculas. Además, han brindado las herramientas necesarias para identificar la estructura molecular de un compuesto, así como para determinar de manera cuantitativa y cualitativa ciertos compuestos tanto orgánicos como inorgánicos.

Se clasifican según la región del espectro electromagnético aplicado en la medición, y estas son: regiones de rayos g, rayos X, ultravioleta (**UV**), visible, infrarrojo (**IR**), microondas y por último las de radiofrecuencia (**RF**) (Skoog & West, 2014). En la figura No.7, se observa la longitud de onda de cada espectro.



1.10.1. Espectroscopía Infrarroja

La espectroscopía se fundamenta en medir la longitud de onda y la absorción de la luz infrarroja media en la muestra. El IR medio ($4000\text{-}200\text{ cm}^{-1}$) permite provocar vibraciones en las moléculas a estados de mayor energía. Por otro lado, la longitud de onda es específica para cada tipo de enlace químico; a excepción de las moléculas diatómicas homonucleares (tales como: O_2 , N_2 , etc.); ya que no absorben la radiación IR (Ivashchenk, et. al., 2015).

Generalmente en un espectro infrarrojo se representa la transmitancia en lugar de la absorbancia en el eje de ordenadas, por lo que las bandas tienen sentido descendente, mientras que en el eje de abscisas aparece el número de onda. Cada molécula o grupo funcional puede mostrar varias bandas de absorción, por lo que

un espectro puede aportar mucha información de tipo cualitativo y estructural. Sin embargo, esta técnica presenta limitaciones en cuanto a su aplicación al análisis cuantitativo (Bermejo & Moreno, 2014, p. 205).

Cabe destacar que en los espectros se pueden diferenciar dos regiones. La región de “frecuencias de grupo” ($4000\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$), región importante para reconocer los posibles grupos funcionales presentes en la sustancia; y la región de la “huella dactilar” ($1200\text{-}600\text{ cm}^{-1}$), región donde la gran cantidad de picos que aparece se deben a los enlaces simples, por lo tanto, esta región está relacionada con la estructura del “esqueleto” del compuesto. La espectroscopía IR es poco costosa, rápida y sencilla de aplicar. Se utiliza para identificar sustancias complejas o sintéticas en estado sólido, líquido y gaseoso; que contengan principalmente moléculas orgánicas y organometálicas (Bermejo & Moreno, 2014).

1.11. Diseño Completamente al Azar (DCA)

El DCA es utilizado cuando no se requiere un control local, ya que el entorno experimental y las condiciones de estudio son semejantes y los tratamientos se asignan a las unidades experimentales mediante una aleatorización completa, sin ninguna limitación (López & González, 2013).

1.12. Análisis de Varianza (ANOVA)

“ANOVA es un procedimiento estadístico relacionado con la comparación de medias de varias muestras. Tiene como objetivo probar las diferencias significativas entre los medios de clase, y esto se hace mediante el análisis de las varianzas” (Ostertagová & Ostertag, 2013, p. 256).

1.13. Prueba de rangos múltiples de Duncan

En esta prueba no se compara las medias con una única diferencia crítica como en el caso de la prueba t-Student. La prueba de Duncan utiliza un valor crítico que depende del número de medias comprendido entre las dos medias que se comparan. Tiene una consistencia moderada, sin embargo no debe utilizarse en varianzas heterogéneas (Fallas, 2012).

Capítulo 2

2. Metodología

2.1. Obtención de la cepa

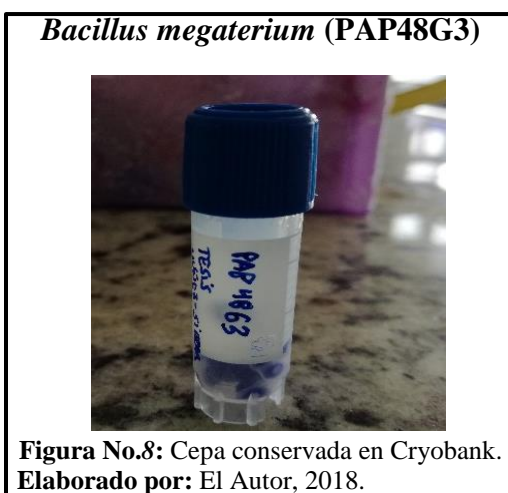
La cepa fue obtenida de muestras del suelo proveniente de la parroquia Conocoto, en la provincia de Pichincha, fue identificada mediante el kit 1 BD BBL™ Crystal™ Identification Systems Gram-Positive ID como *Bacillus megaterium* por Núñez & Sierra (2018) y fue conservada en perlas del CRYOBANK del grupo BIOARN a una temperatura de -80 °C, con la codificación PAP48G3 (ver figura No.8), en donde:

PA: Proyecto Antibióticos

P: Pichincha

48: Número del periodo obtenido la cepa

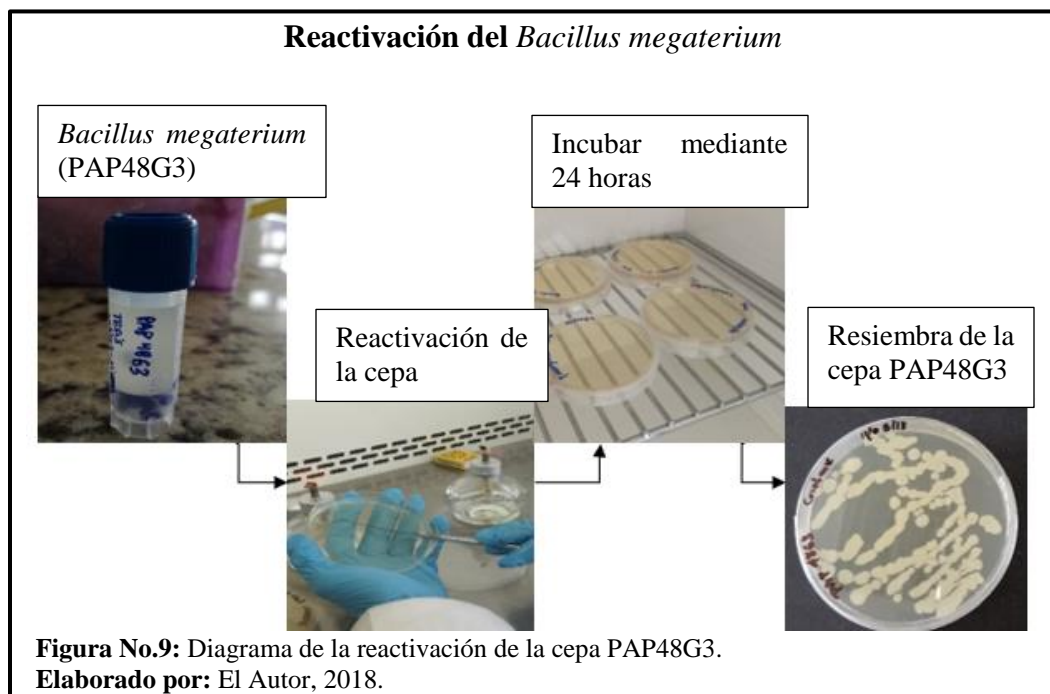
G3: Colonia



2.2.Reactivación de la cepa

Se seleccionó una perla del CRYOBANK con *Bacillus megaterium* (PAP48G3) con ayuda de una aguja de inoculación.

Se sembró en placas de Petri estériles con 25 mL de medio TSA (Tryptic Soy Agar), mediante la técnica de estriado simple y se incubó a una temperatura de 37 °C durante 24 horas (figura No.9).



2.3. Preparación del inóculo del Biorreactor

2.3.1. Preparación del medio ISP2

Se elaboró 2000 mL de medio ISP2 (4 g. de extracto de levadura, 10 g de extracto de malta, 4 g de dextrosa en 1000 mL de agua destilada) suplementado con 1.2 % de NaCl. Luego se procedió a regular el pH del medio de cultivo a 7 ± 0.2 .

Posterior a la preparación del medio de cultivo se incorporó el caldo en el biorreactor marca y modelo (New Brunswick BioFlo/CelliGen 115®) de un volumen de 2000 mL para finalmente esterilizar en el autoclave durante 15 minutos a 121°C de temperatura y una atmosfera de presión (figura No.10).



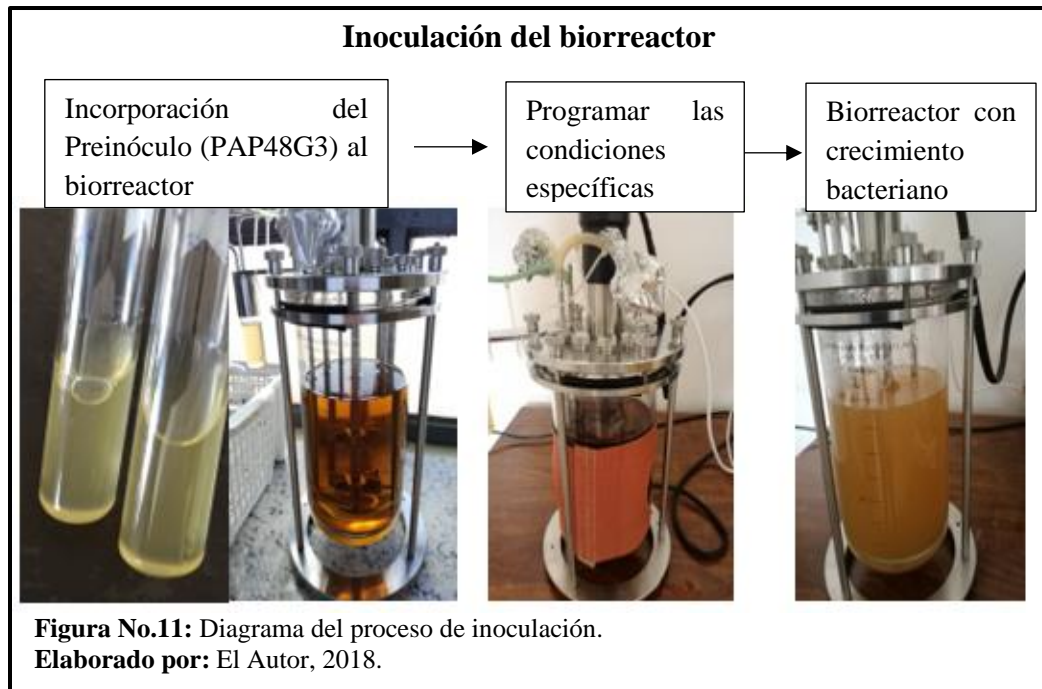
2.3.2. Elaboración del preinóculo

Este proceso se basó en la metodología descrita por Sierra & Romero (2012, p.7), en donde se colocó 20 mL de medio ISP2 estéril en un tubo de ensayo y se inoculó seleccionando 1 UFC de *Bacillus megaterium* (PAP48G3) con un asa estéril. Se incubó durante 24 horas a 30 ± 2 °C, en una incubadora con agitación (New Brunswick™ Excella® E24); obteniendo un cultivo overnight de una concentración aproximada de 12×10^8 UFC/mL (McFarland No.4).

2.3.3. Inoculación del biorreactor

Una vez preparado el preinóculo se incorporó en el biorreactor (BioFlo® / CelliGen™), el mismo que contenía los 2000 mL de medio ISP2 estéril.

Cabe mencionar que se incubó la misma cepa durante dos intervalos diferentes de tiempo: el primero durante 3 días, y el segundo de 4 días; las condiciones en las que se sometió la cepa PAP48G3 fueron de 30 ± 2 °C. y 150 rpm. En la figura No.11 se indica el proceso de inoculación que se realizó.



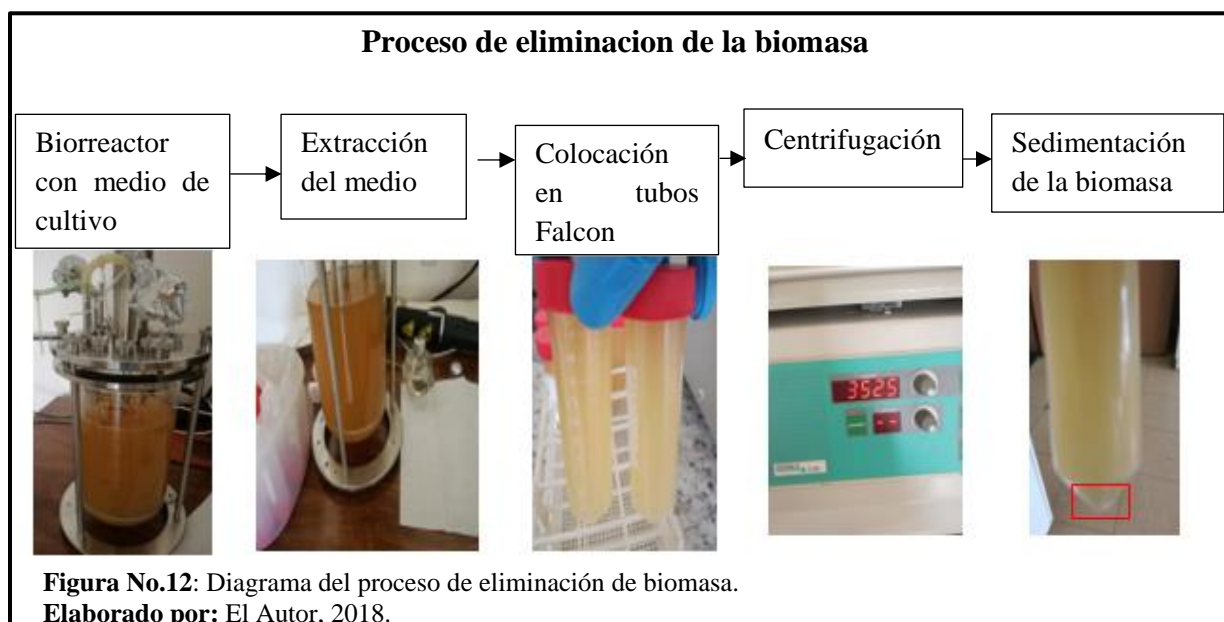
2.4. Obtención del antibiótico

Para la obtención del antibiótico se siguió la metodología de Hussain, et. al. (2018, p. 197) con algunas modificaciones.

2.4.1. Eliminación de la biomasa

Transcurrido el tiempo de incubación se extrajo el caldo de cultivo con *Bacillus megaterium* del bioreactor con Tubos Falcon™ de 50 mL y se centrifugó a 3860 rpm durante 10 min, para sedimentar la biomasa bacteriana del medio.

El sobrenadante se colocó en frascos ámbar de 1000 mL. previamente esterilizados y se les refrigeró. En la figura No.12 se encuentra la descripción gráfica del proceso.

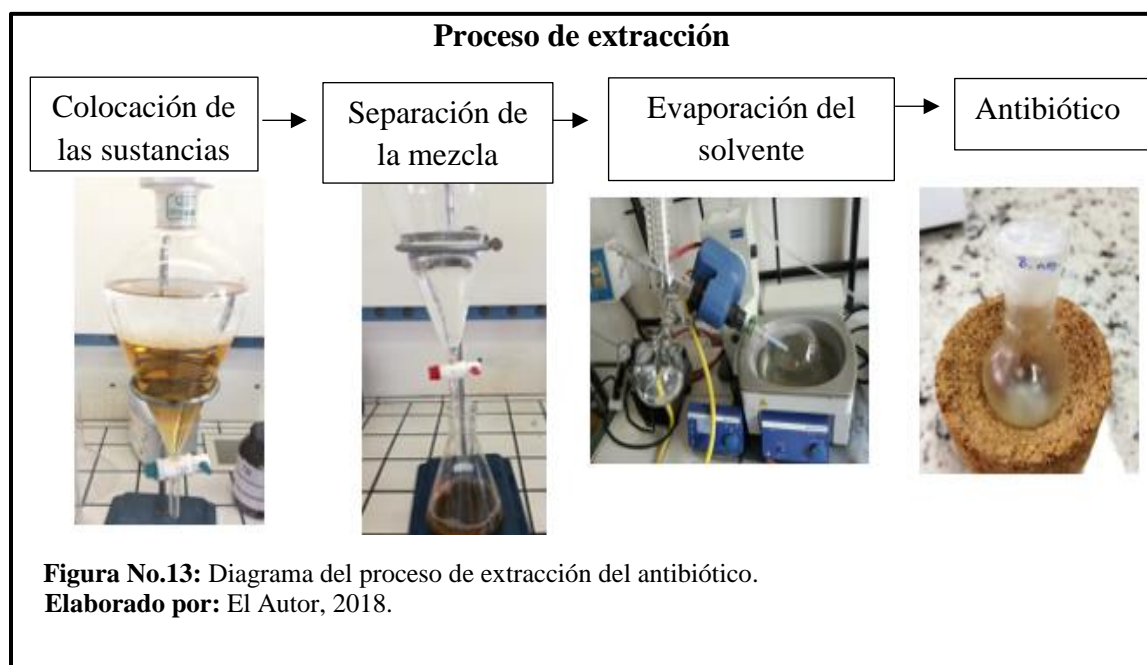


2.4.2. Extracción del antibiótico

Se realizó una extracción líquido-líquido en embudos de extracción de 1000 mL, incorporando el hexano y el medio del cultivo con el metabolito de interés a una proporción de 1:1. Una vez incorporadas las sustancias se agitó durante 2 minutos, para obtener un equilibrio entre las dos fases y de tal manera extraer con el disolvente las moléculas orgánicas que son inmiscibles con el agua.

Se recolectó el extracto orgánico y se llevó al rotavapor (IKA® RV 10 basic), utilizando una temperatura de 50 ± 2 °C. para eliminar el Hexano del extracto y de tal forma recolectando el antibiótico. Finalizada la evaporación del solvente, se pesó el antibiótico en balones de 15 mL mediante el uso de una balanza analítica.

Por último, se conservó en refrigeración para sus posteriores análisis. Este proceso se realizó en el caldo de cultivo luego de 3 y 4 días. En la figura No.13 se observa la descripción gráfica del proceso.



2.5. Análisis del antibiótico extraído

2.5.1. Análisis mediante espectroscopía infrarroja (IR)

2.5.1.1. Purificación de la muestra para el análisis

Para eliminar las impurezas del antibiótico extraído se colocó 5mL de hexano en el balón con el antibiótico y se agitó la muestra con ayuda del Vórtex durante 1 minuto para disolverlo. Posterior, se recolectó la mezcla con ayuda de una jeringa de 5 mL y se colocó

en la misma un filtro PVDF 0.45 μm , de este modo se filtró el solvente con la muestra reteniendo las impurezas o residuos de caldo de cultivo.

Se transfirió la muestra en otro balón y el sobrante del solvente se evaporó en el rotavapor (IKA® RV 10 basic). Por último, se realizó una nebulización en la muestra con nitrógeno gaseoso (N_2) durante 5 minutos para eliminar residuos de hexano. En la figura No.14 se detalla la metodología realizada.

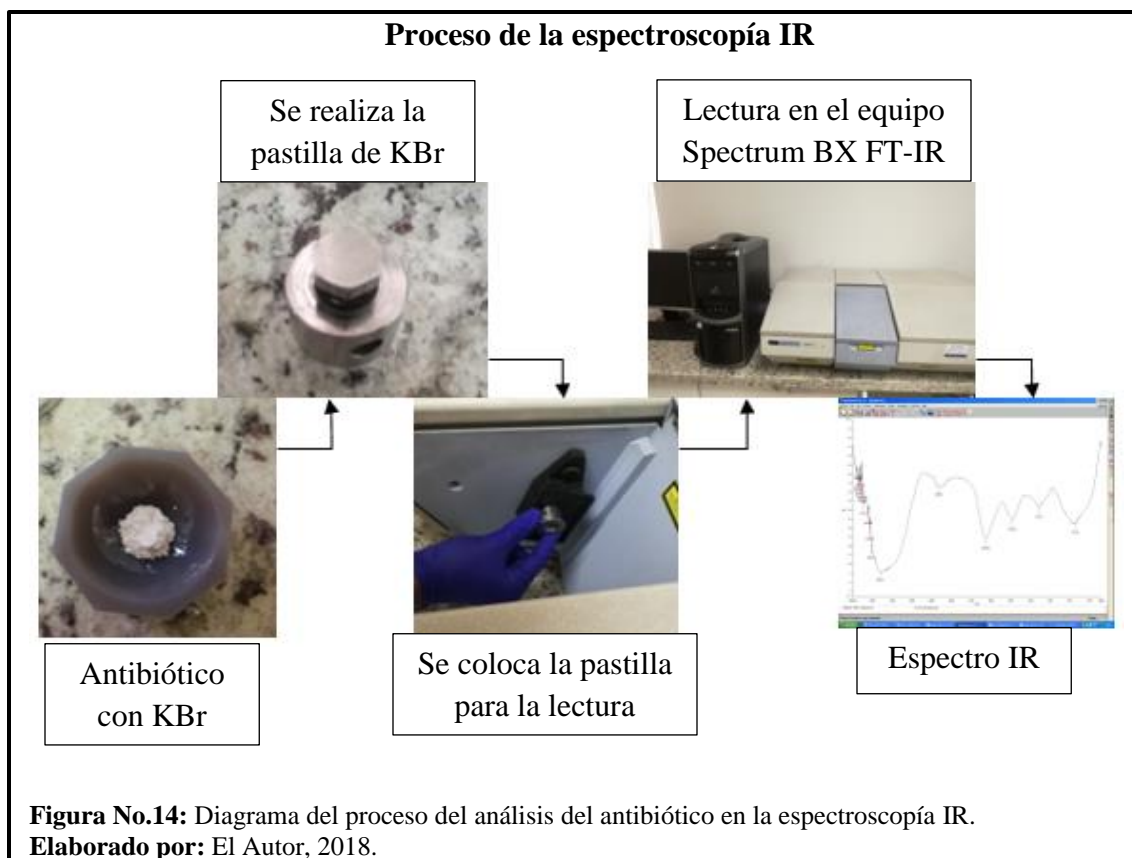


2.5.1.2. Análisis de la muestra

Este análisis se basó en la metodología de Bermejo & Moreno (2014, p.217), en donde:

Una vez purificada la muestra se molió 100 mg de bromuro de potasio (KBr) en un mortero de agata y se incorporó 5 mg de antibiótico purificado, realizando una pastilla de KBr con ayuda del troquel.

Finalmente, se ejecutó la lectura en el equipo (Spectrum BX FT-IR) y se analizó en el *software Spectrum v5.3.1.* Este proceso se repitió tres veces con el antibiótico de 3 y 4 días. En la figura No.15 se describe el proceso.



2.5.2. Purificación del compuesto por cromatografía en capa fina (TLC)

2.5.2.1.Preparación de la móvil

En este ensayo se realizaron combinaciones de solventes en diferentes proporciones; obteniendo tres fases móviles, tales como: Acetato de etilo-Cloroformo (3:1) v/v, Acetato de etilo-Cloroformo (2:1) v/v y Acetato de etilo-Cloroformo (1:1) v/v.

2.5.2.2.Preparación de la muestra

Se disolvió el antibiótico con diclorometano obteniendo una concentración de 10 mg/mL.

2.5.2.3.Preparación de las placas cromatográficas

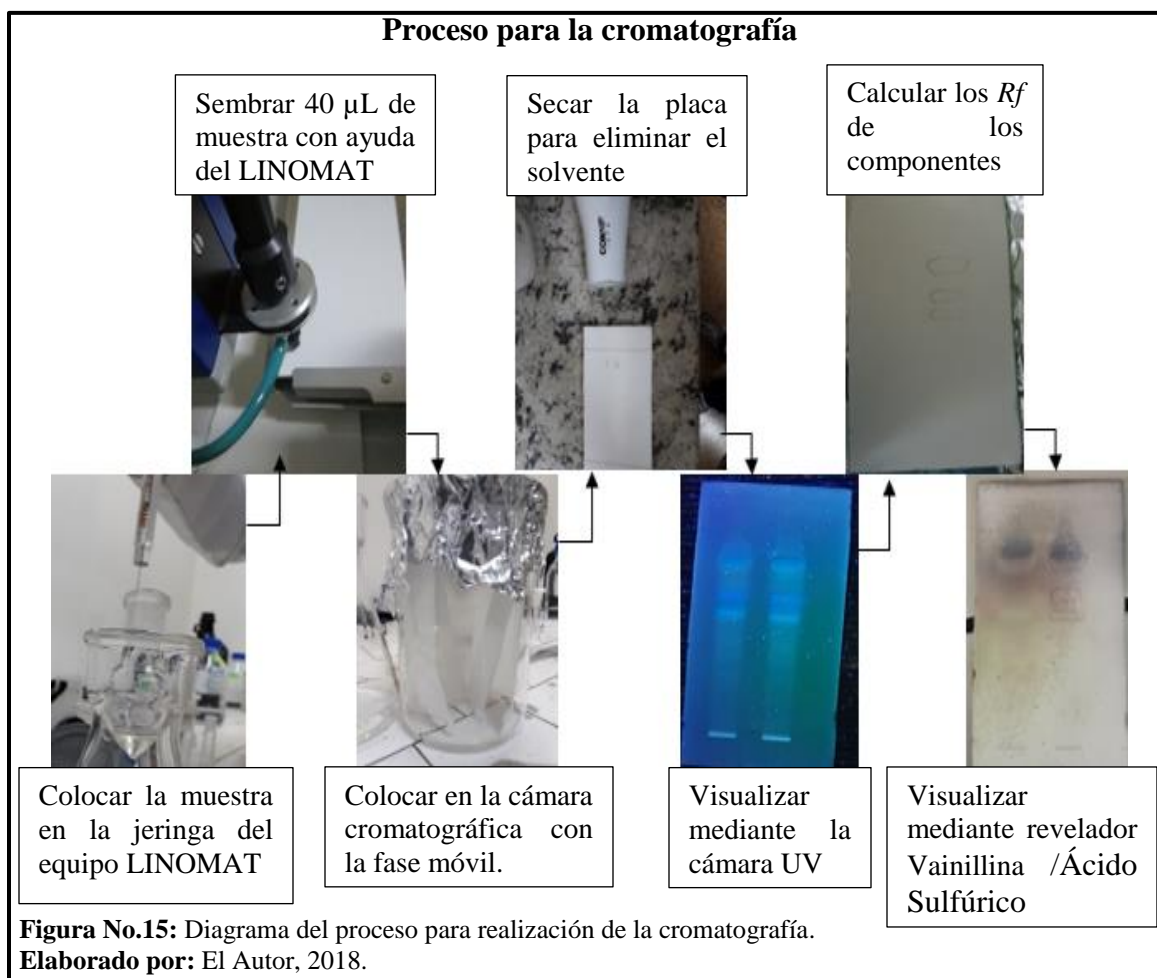
Para este proceso se siguió la metodología de Móricz,et.al. (2017, p. 5), por lo cual:

Para la fase estacionaria se utilizaron placas de silica gel marca (Sigma-Aldrich®, L × W 10 cm × 10 cm con factor de fluorescencia a 254 nm), la misma se le dividió en dos obteniendo una placa de 10 x 5 cm. Luego se sembró 40 µL de muestra con ayuda del equipo LINOMAT- 5 (CAMAG), a 1 cm del largo de la placa cromatográfica.

Previamente se saturó con la fase móvil la cámara cromatográfica por un tiempo de 40 minutos para que el solvente arrastre los compuestos de la mezcla. Posterior de la saturación se incorporó la placa con la muestra y se calculó el tiempo antes de que el solvente llegue al límite de la placa. Luego de la separación de la muestra se retiró la placa y se secaron los residuos de la fase móvil con una secadora por un tiempo de 10 minutos.

Los componentes separados se visualizaron mediante una lámpara UV marca (CAMAG UV Cabinet), se visualizaron las muestras bajo luz UV a 254 nm (absorbancia) y 365 nm (fluorescencia) y se señaló con lápiz las distancias recorridas por las manchas. Luego se procedió a revelar la placa con el uso del revelador químico de Vainillina/Ácido Sulfúrico (2 g de vainillina y 50 mL de H₂SO₄ concentrado).

Finalmente, se calentó la placa a una temperatura de 110 °C durante 5 minutos para eliminar residuos sobrantes. Se puede observar el proceso de la cromatografía en la figura No.16.



2.5.3. Bioautografía

2.5.3.1. Preparación de la placa cromatográfica

Este proceso se basó en la metodología de Móricz, et al. (2017, p. 5) y se siguieron los mismos pasos descritos en el literal 2.5.2.3. con algunas modificaciones:

Se realizó por duplicado la siembra del antibiótico en la placa cromatográfica de tamaño 10 X 5 cm con el equipo LINOMAT- 5 (CAMAG), colocando la cantidad de 40 μL de muestra por siembra en la concentración mencionada anteriormente. La fase móvil utilizada fue de Acetato de etilo- Cloroformo (3:1), en la cual se puso la placa en la cámara

cromatográfica y se dejó correr durante 20 minutos. Posteriormente se dejó secar en el ambiente la placa con ayuda de una secadora durante 10 minutos con aire frío.

Por último, se visualizó bajo luz UV a 254 nm (absorbancia) y 365 nm (fluorescencia) para comprobar que la muestra se separó en los componentes observados en la cromatografía TLC anterior. Una vez comprobada la separación de la muestra se encuentra lista para ser usada en la Bioautografía.

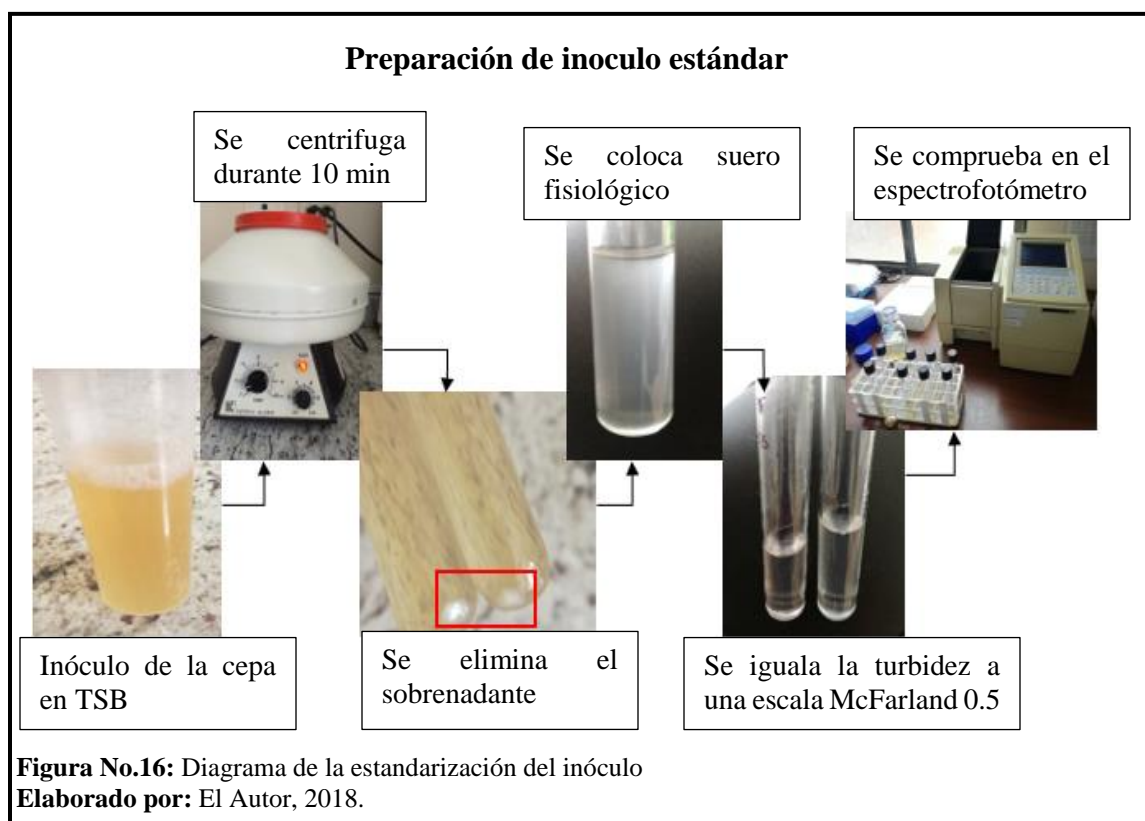
2.5.3.2. Preparación de los microorganismos de control

Las cepas certificadas que se utilizaron en la bioautografía fueron: se utilizó *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633) como control de bacterias Gram positivas y para bacterias Gram negativas se utilizó *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027). Se seleccionó la ATCC 6633 y la ATCC 9027 porque están certificadas para realizar ensayos de actividad antimicrobiana, pruebas de susceptibilidad y de eficacia de fármacos.

Para obtener una concentración de 1.5×10^8 UFC/ mL (McFarland 0.5) de los microorganismos de control, se siguió la metodología descrita por Carlone & Pompei (2013, p. 286).

Posteriormente se centrifugó el medio TSB durante 10 min a 4000 rev, se desechó el sobrenadante y se restauró el Pellet del microorganismo con solución salina al 0.85 %, se repitió este paso una vez mas para eliminar residuos del medio TSB.

Se incorporó la solución salina hasta obtener una turbidez similar a la escala 0.5 McFarland y se comprobó en el espectrofotómetro UV marca (Shimadzu UV mini 1240) utilizando entre 0.08 - 0.2 de absorbancia a una longitud de onda de 625 nm. Observar el proceso en la figura No.17.



2.5.3.3. Preparación del cloruro de trifeniltetrazolio al 1% (TTC)

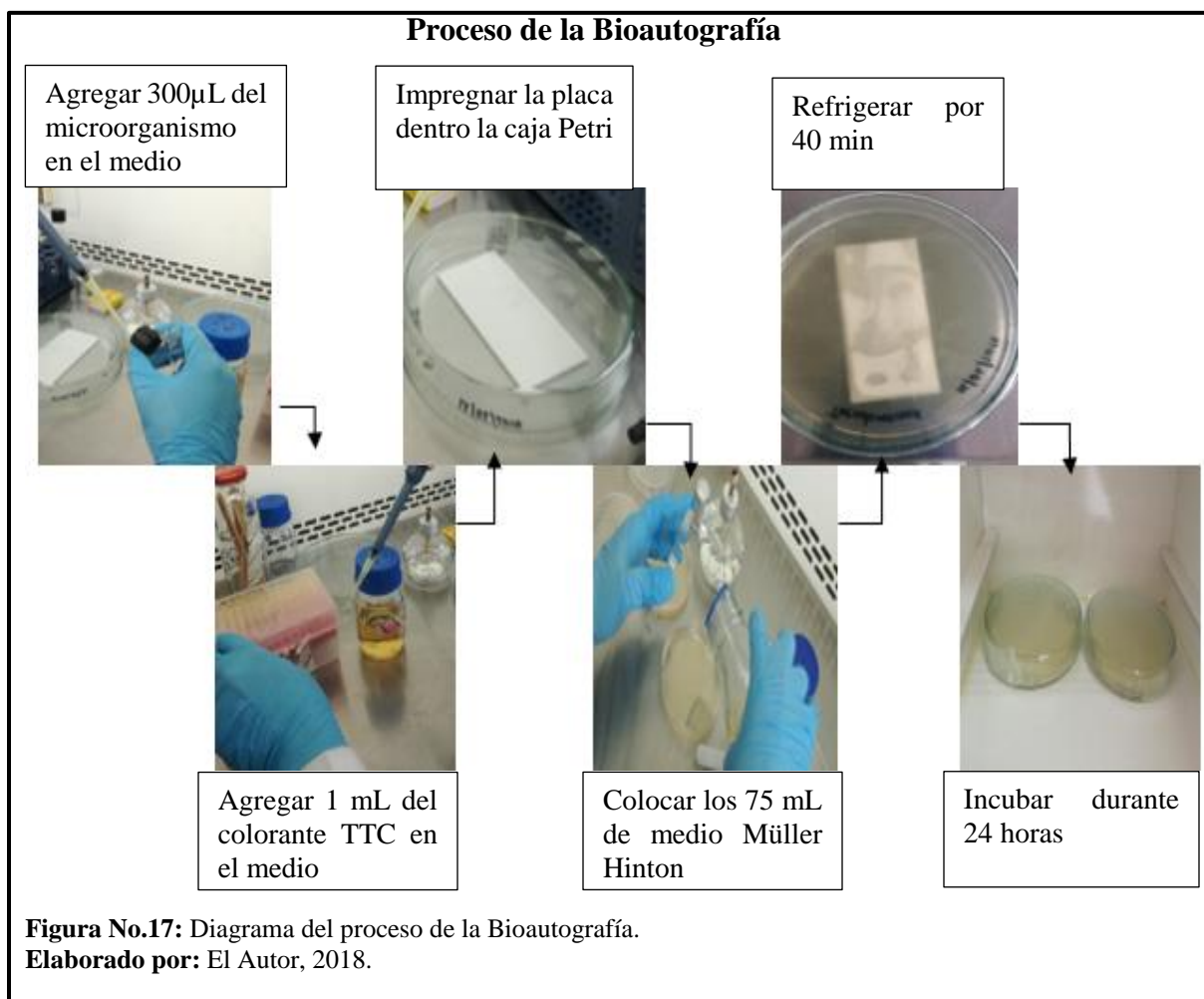
Para preparar el reactivo se incorporó 100 mg de TTC en 10 mL de agua estéril fría y se agitó hasta homogenizar el reactivo. Se dejó reposar la mezcla cubriendo con papel aluminio y en refrigeración hasta su uso.

2.5.3.4. Impregnación de la placa con el microorganismo control

Esta técnica se apoyó en el proceso mencionado por Sánchez, et.al. (2016, pp. 89,91).

Antes de incorporar 75 mL del medio Müller Hinton estéril en la caja Petri de 150 mm de diámetro se incorporó 300 μ L de la cepa control y 1 mL del colorante TTC, se homogenizó la mezcla con agitación y se incorporó el medio lentamente en la caja Petri para evitar la formación de burbujas de aire en el agar y cubriendo totalmente la placa cromatográfica.

Se colocó la caja Petri en refrigeración por un tiempo de 45 minutos y se incubó durante 24 horas a una temperatura de 37 °C. Transcurrido el tiempo indicado se midió el R_f de los compuestos antimicrobianos que produjeron antibiosis y de igual forma se midió el halo de inhibición producido por la bioautografía. Este proceso se repitió aplicando la cepa *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633) y *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027). En la figura No.18 se puede observar la descripción gráfica del proceso.



2.5.4. Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Esta técnica se basó en la publicación de Balouiri, Sadiki, & Ibnsouda (2016, pp 75-76).

2.5.4.1. Preparación de los microorganismos de control

Para la preparación del inóculo a una concentración de 1.5×10^8 UFC/ mL (McFarland No. 0.5) se utilizaron las cepas certificadas. Para el control de bacterias Gram positivas se utilizó *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633) y para bacterias Gram negativas se utilizó *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027). Se realizó la metodología del literal 2.5.3.2.

2.5.4.2. Preparación de la muestra estándar

Se disolvió el antibiótico con dimetilsulfóxido (DMSO) obteniendo así una concentración de 10 mg/mL. Para el control positivo en la técnica de la microdilución en caldo se utilizó la gentamicina en una concentración de 40 mg/mL ya que es un antibiótico comercial de amplio espectro.

2.5.4.3. Microdilución en caldo

Se utilizaron microplacas de poliestireno de alta transparencia de 96 pocillos de la marca VWR® colocando las muestras con ayuda de una micropipeta multicanal de 12 canales con una cantidad total de 100 μ L en cada uno de los pocillos.

Se llenó la primera fila (A) de la microplaca de la siguiente manera:

- De la **A₁** a la **A₈**: se colocó 10 μ L del antibiótico y 90 μ L de medio TSB estéril.
- En la **A₉** y **A₁₀**: se puso 100 μ L de TSB estéril para el “blanco”.
- En la **A₁₁** y **A₁₂**: se introdujo 10 μ L de gentamicina y 90 μ L de medio TSB estéril para el “control positivo”.

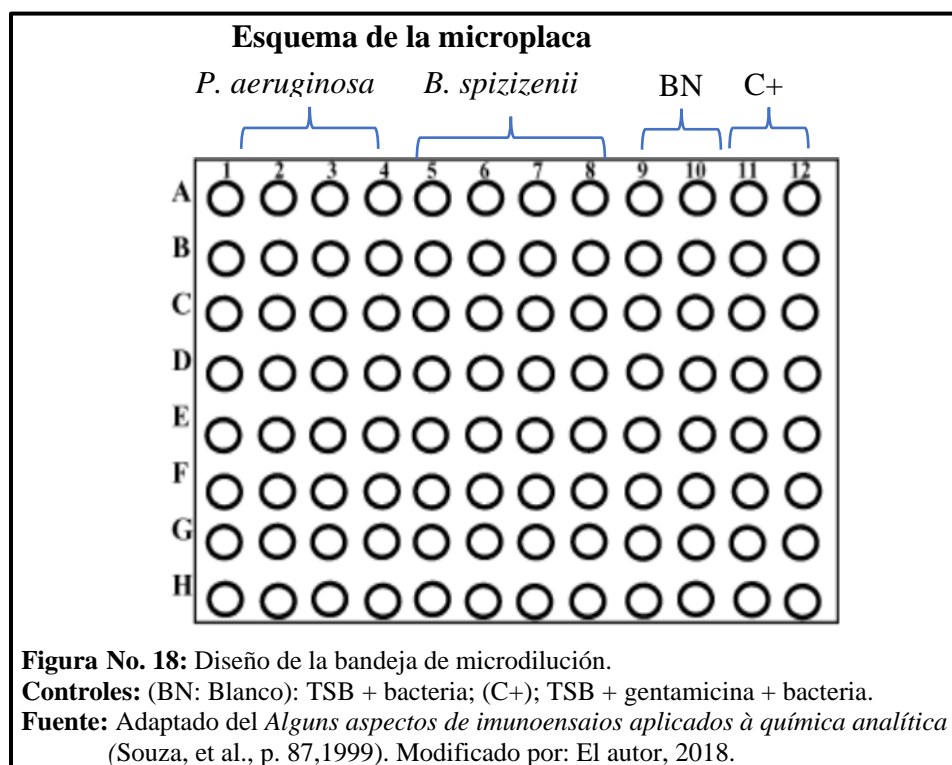
Luego de la segunda fila en adelante (B – H) se incorporó 50 μ L de TSB. Posteriormente con ayuda de una micropipeta multicanal de 12 canales, se mezcló y se traspasó 50 μ L de

la primera fila a la segunda y así sucesivamente hasta la última fila desechando los 50 µL sobrantes.

Luego de la dilución del antibiótico se prosiguió a colocar 50 µL de los inóculos de las cepas de control en la microplaca. Las columnas y las cepas inoculadas se detallan a continuación:

- En la columna **1, 2, 3, 4, 9 y 11:** se colocó 50 µL del inóculo de *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027).
- En la columna **5, 6, 7, 8, 10 y 12:** se puso 50 µL del inóculo de *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633).

Una vez finalizado el llenado de los pocillos con un volumen final de 100 µL en cada uno, se colocó la microplaca en la incubadora con agitación marca (New Brunswick™ Excella® E24) durante 24 horas a una temperatura de 37 °C. (Ver figura No.19)



Las concentraciones obtenidas luego de la dilución tanto del antibiótico extraído de *Bacillus megaterium* como del antibiótico comercial “Gentamicina”, se encuentran descritos en la tabla No.3.

Tabla No.3. Diseño de la microplaca con las concentraciones de los antibióticos utilizados en µg/mL.

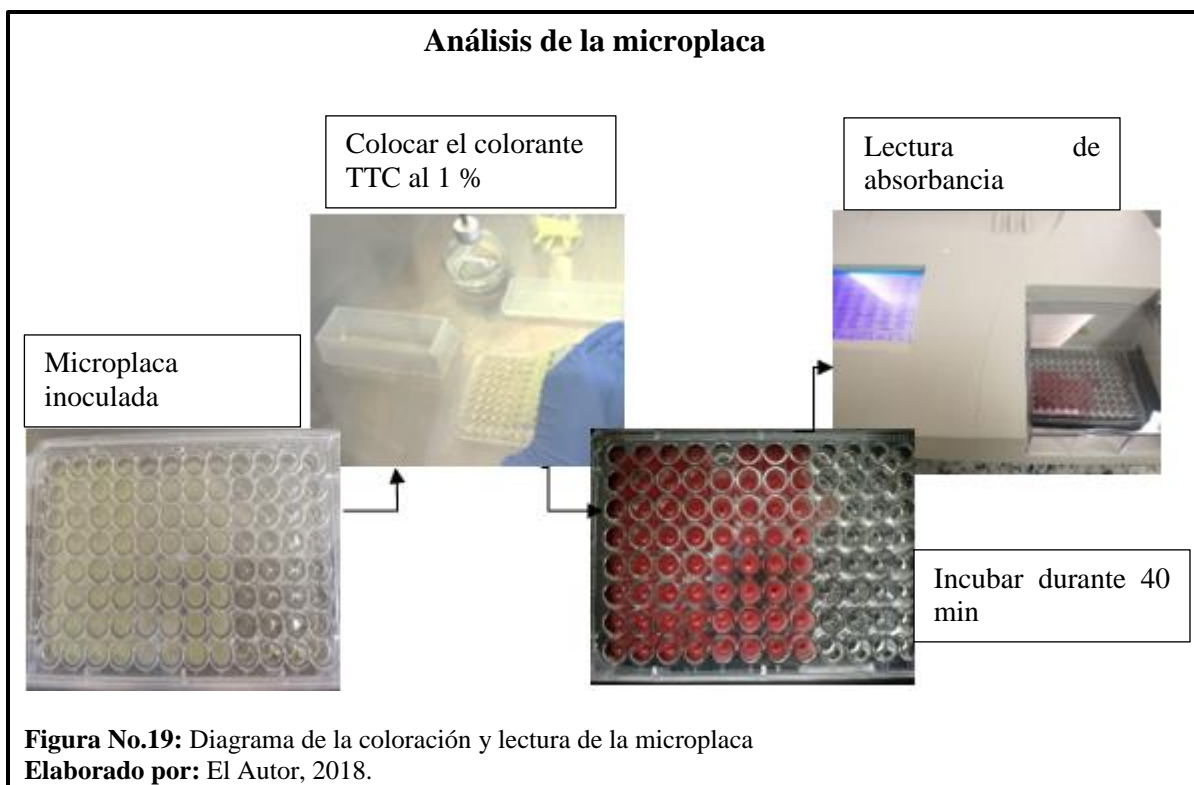
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	500	500	500	500	500	500	500	500	-	-	1000	1000
B	250	250	250	250	250	250	250	250	-	-	500	500
C	125	125	125	125	125	125	125	125	-	-	250	250
D	62.50	62.50	62.50	62.50	62.50	62.50	62.50	62.50	-	-	125	125
E	31.70	31.70	31.70	31.70	31.70	31.70	31.70	31.70	-	-	62.50	62.50
F	15.90	15.90	15.90	15.90	15.90	15.90	15.90	15.90	-	-	31.70	31.70
G	7.90	7.90	7.90	7.90	7.90	7.90	7.90	7.90	-	-	15.90	15.90
H	3.90	3.90	3.90	3.90	3.90	3.90	3.90	3.90	-	-	7.90	7.90

Nota: Elaborado por el Autor, 2018

2.5.4.4. Incorporación del TTC al 1 % en la microplaca

Una vez transcurrido las 24 horas de incubación se colocó en los 96 pocillos la cantidad de 25 µL del TTC al 1 % previamente preparado. Nuevamente se introdujo en la incubadora con agitación marca (New Brunswick™ Excella® E24) durante 40 minutos a una temperatura de 37 °C hasta obtener cambios de coloración. Se detalla en la figura No.20.

Posteriormente, se analizó la coloración de los pocillos y la lectura de la absorbancia en el equipo Micropilote Reader para el respectivo análisis estadístico.



2.5.4.1. Análisis estadístico

Se utilizó la fórmula de Rubegeta, et al. (2018), para determinar el porcentaje de inhibición provocado por el antibiótico obtenido.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{Ab_{BN} - Ab_{muestra}}{Ab_{BN}} \times 100$$

Donde:

Ab_{BN} = Absorbancia del blanco.

Ab_{muestra} = Absorbancia de la obtenida.

Para el análisis estadístico ANOVA se aplicó un diseño experimental DCA que permitió observar el porcentaje de inhibición que produjo el antibiótico frente a cada uno de los

microorganismos de control y analizar el porcentaje de inhibición entre *Pseudomona aeruginosa* y *Bacillus spizizenii*. Para evaluar los resultados de la MIC se utilizó el programa Infostat” versión 2015” y se desarrolló las pruebas Post Hoc de Duncan 5 %.

Capítulo 3

3. Resultados y Discusión

3.1. Obtención del antibiótico

Al inocular la bacteria en el caldo ISP2 conformado por: extracto de levadura, extracto de malta y dextrosa; aumenta la capacidad de producir antibióticos ya que este medio posee los nutrientes necesarios para incentivar al microorganismo en la producción del metabolito (Bernice & Regi, 2014). Silva, et al. (2016) señalan que el medio ISP2 es una buena alternativa para generar moléculas bioactivas con actividad antimicrobiana. Por lo tanto, la selección de medios de cultivos es muy importante para la producción de antibióticos por microorganismos ya que aumenta el rendimiento de éstos.

La producción del antibiótico en dos periodos de tiempo diferente se basó en el estudio de Núñez & Sierra (2018), quienes mencionan que el antibiótico en el día 4 produce una mayor inhibición para *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633) mientras que en el día 3 genera una mayor inhibición contra *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027). Además, para obtener un mejor rendimiento de antibiótico, la bacteria se inoculó con las condiciones de estrés de 1.2 % de salinidad y un pH de 7 ± 0.2 ; según Marinelli & Molinari (2012) mencionan que varios parámetros de fermentación como: pH, temperatura, salinidad, etc., permiten mejorar el crecimiento de la bacteria y la biosíntesis del metabolito de interés.

La cantidad de antibiótico que se obtuvo del medio ISP2 en los dos periodos se encuentran descritos en la tabla No.4, donde se observó que en el cuarto día la cantidad de antibiótico fue mayor en comparación del día tres (Ver anexo No.1).

Tabla No. 4. Cantidad de antibiótico obtenido del medio ISP2 mediante la extracción con hexano.

Bacteria	Codificación	Cantidad de medio (mL)	Tiempo (días)	Cantidad de antibiótico (mg)
<i>Bacillus megaterium</i>	PAP48G3	2000 mL	3	45.10 mg
			4	52.20 mg

Elaborado por: El Autor, 2018

Para la selección del solvente orgánico es necesario que el disolvente sea apolar ya que entre más polar sea el solvente, más miscible es con el agua por tal motivo en esta investigación se utilizó como solvente orgánico el hexano ya que es inmisible en agua (Guarnizo & Martinez, 2009).

Según Acosta, et al. (2010) la extracción líquido-líquido de antibióticos con solventes orgánicos es más viable que el método de la destilación cuando el metabolito a extraer es poco volátil o no volátil. Además, se recomienda este método de extracción en compuestos termolábiles como hormonas o antibióticos.

3.1.1. Espectroscopía Infrarroja (IR)

Se realizó la lectura de los espectros infrarrojos del antibiótico purificado del día 3 y del día 4 para verificar si variaba algún grupo funcional de las muestras antibacterianas obtenidas. En ambos espectros estuvieron presentes los mismos grupos funcionales y fueron: grupo amino N-H ($3300-3500\text{ cm}^{-1}$) permitió identificar como amidas primarias al enlace del grupo carbonilo C=O ($1630-1700\text{ cm}^{-1}$) ya que muestran una banda debido a la flexión del grupo N-H, grupo hidroxilo O-H ($3200-3500\text{ cm}^{-1}$) es una banda ancha la cual permite diferenciar del grupo amino que posee dos bandas (simétrica y asimétrica),

grupo alcano C-H deformado ($1365\text{-}1385\text{ cm}^{-1}$) y grupo alcoxi C-O ($1000\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$) reconocidos como éteres (Ver anexo No. 2).

Varios de los antibióticos producidos por los microorganismos presentan el grupo amino N-H en su estructura química; ya que contienen D- aminoácidos que son característicos de los antibióticos naturales y de las paredes celulares de las bacterias (Hernández R. , 2006). Según Anaya, et al. (2001) afirma que el grupo amino brinda la propiedad antimicrobiana en ciertos antibióticos. Por tal motivo es necesario utilizar métodos analíticos como la espectroscopia IR ya que es muy útil y popular para la identificación de aproximadamente el 60 % compuestos químicos (Sadlej, et al., 2006). Además, su aplicación en el área de investigación de fármacos es muy importante ya que permite describir las estructuras químicas de sustancias antimicrobianas producidas por los microorganismos del suelo.

En los espectros no se visualizaron grupos funcionales, tales como: alquenos, alquinos, nitrilos, ácidos y compuestos aromáticos. Cabe destacar que el antibiótico fue purificado usando los filtros PVDF $0.45\text{ }\mu\text{m}$ previo al análisis, de este modo eliminando impurezas y residuos del solvente utilizado en la extracción.

3.1.2. Cromatografía en capa fina

La TLC del antibiótico se realizó utilizando placas de silica gel marca (Sigma-Aldrich®, $L \times W\text{ }10\text{ cm} \times 5\text{ cm}$ con factor de fluorescencia a 254 nm) como fase estacionaria y la mayor separación de moléculas se obtuvo usando la fase móvil compuesta por Acetato de etilo- Cloroformo (3-1), ya que permitió una mejor separación de los componentes del antibiótico en un tiempo de 20 min. (Ver anexo No.3). Komsta, et al. (2014) mencionan que la separación de las fracciones de la muestra en la TLC puede depender de la selección

del adsorbente, del soporte y de la fase móvil (sea polar o no polar) ya que según el material elegido el desplazamiento de las moléculas de la muestra puede variar.

Se utilizó la luz UV a 254 nm (absorbancia) y a 365 nm (fluorescencia) para poder visualizar la coloración de las fracciones. Según Volontè & Quiroga (2013), una gran cantidad de sustancias pueden ser identificadas por su longitud de onda. En el caso de la longitud de onda corta (UV a 254 nm) los compuestos pueden observarse como manchas oscuras en un fondo verde, esto se debe a que el indicador de la fluorescencia de las moléculas se inactiva por la absorción de la luz; mientras que en la longitud de onda larga (UV a 365 nm) los compuestos con naturaleza fluorescente se podrán visualizar fácilmente. Algunos compuestos no absorben la luz UV, ya que se encuentran en su forma iónica en la placa debido al pH de la fase móvil o estacionaria (Sherma, 2013; Volontè & Quiroga, 2013).

Luego de visualizar las fracciones se calculó el valor R_f de las moléculas bioactivas separadas. Los R_f calculados fueron tres y son: $R_f=0.44$, $R_f=0.49$ y $R_f=0.61$. (Ver anexo No.4). Para calcular el valor del factor R_f es necesario que las variables como la temperatura, el adsorbente y su grosor, la cantidad de muestra, etc., sean constantes; al ser complicado replicar estas condiciones se utilizan compuestos de referencia para la identificación de sustancias (Chen, et al., 2014).

Cuando se usó el revelador de Vainillina/Ácido Sulfúrico y se calentó la placa a temperatura alta se pudo observar una coloración violeta en el compuesto con un $R_f=0.61$; estos reactivos agresivos tales como el ácido sulfúrico concentrado se utilizan para revelar compuestos que no presentan color propio, absorción al UV, ni fluorescencia (Volontè & Quiroga, 2013).

3.1.3. Bioautografía

Para identificar los agentes antimicrobianos de la muestra se realizó la bioautografía de inmersión por duplicado, donde se sembró en la placa cromatográfica una cantidad de 40 μ L de antibiótico con una concentración de 10 mg/mL. La placa previamente separada se sumergió en el medio de cultivo que contenía el colorante TTC y la cepa de control certificada. Dewanjee, et al. (2015) afirman que luego de la solidificación e incubación del medio (incluye las sales de tetrazolio) se puede visualizar las bandas de inhibición y de crecimiento microbiano.

Mediante el colorante TTC se pudo visualizar los halos de inhibición producidos por la cepa de *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633) solo en las moléculas bioactivas con $R_f= 0.61$. Los halos de inhibición tenían un diámetro de 7.3 mm. Por otro lado, en la bioautografía realizada con la cepa de control *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027) se pudo evidenciar halos de inhibición de 1.2 mm de diámetro únicamente en los componentes con $R_f=0.61$. (Ver anexo No.5).

La coloración violeta se debe a que las enzimas deshidrogenasas producidas por las bacterias reducen las sales de tetrazolio en formazan y de ese modo se puede confirmar la presencia del microorganismo. En el caso de la ausencia del microorganismo se presenta un halo de inhibición con una coloración crema. (Choma & Grzelak, 2011).

3.1.4. Evaluación de la MIC

Para la evaluación de la MIC se realizó la técnica de microdilución en caldo, con este método es fácil reproducir la prueba y además permite economizar la cantidad de muestra usada en los ensayos (Balouiri, 2016). Para el análisis cualitativo se analizó la presencia

o ausencia del crecimiento microbiano con el antibiótico obtenido de la cepa de *Bacillus megaterium* y se evaluó usando el revelador TTC para identificar la densidad del colorante aplicado. Ramirez & Castaño (2009) afirman que la presencia de las células vivas genera cristales violetas, lo que permite evidenciar la actividad microbiana. En el anexo No.5 se puede observar que la coloración violeta aparece a partir de la concentración de antibiótico de 125 µg/mL (Fila C) para ambos microorganismos de control. Cabe destacar, que en el control positivo no se evidenció presencia de crecimiento microbiano mientras que en el blanco si hubo coloración violeta por el crecimiento microbiano.

Otra alternativa para la lectura y registro de resultados de la microdilución en caldo es utilizar un lector para identificar el desarrollo o la ausencia del microorganismo (Malbrán, 2012). En el análisis cuantitativo del MIC se evaluaron las absorbancias de la microplaca en el equipo Microplate Reader en donde se interpreta que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración bacteriana, es decir, entre mayor es la lectura mayor será el crecimiento microbiano o viceversa. Como se puede observar en la tabla No.5, la absorbancia de las filas A y B que corresponden al antibiótico con una concentración de 500 µg/mL y 250 µg/mL respectivamente, tiene un valor inferior de absorbancia por lo cual el crecimiento microbiano de ambos microorganismos es casi nulo.

En el blanco se observa una alta absorbancia en todos los pocillos comprobando que las cepas utilizadas obtuvieron una alta concentración bacteriana en el medio TSB estéril, mientras que para el control positivo la gentamicina en una concentración inicial de 1000 µg/mL produjo una completa inhibición en todas las diluciones tanto para *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027) como para *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633).

Tabla No. 5. Lectura de absorbancias de la MIC obtenidas mediante el equipo Microplate Reader

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,030	0,000	0,025	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,311	0,325	0,000	0,000
B	0,080	0,060	0,086	0,032	0,070	0,080	0,000	0,034	0,289	0,279	0,000	0,000
C	0,178	0,167	0,143	0,165	0,083	0,114	0,078	0,109	0,315	0,324	0,000	0,000
D	0,203	0,165	0,255	0,261	0,122	0,074	0,096	0,121	0,279	0,285	0,000	0,000
E	0,229	0,241	0,283	0,223	0,173	0,178	0,191	0,142	0,287	0,264	0,000	0,000
F	0,208	0,244	0,240	0,226	0,183	0,174	0,189	0,175	0,310	0,365	0,000	0,000
G	0,230	0,251	0,256	0,252	0,186	0,194	0,188	0,189	0,311	0,258	0,000	0,000
H	0,256	0,253	0,283	0,260	0,195	0,200	0,113	0,192	0,299	0,266	0,000	0,000

Nota: Columna 1 – 4: inoculadas con la cepa certificada de *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027) y con antibiótico de *Bacillus megaterium* (PAP48G3). 5 – 8: inoculadas con la cepa certificada de *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633) y con antibiótico de *Bacillus megaterium* (PAP48G3). 9: (Blanco): medio TSB estéril + *Bacillus spizizenii*. 10: (Blanco): medio TSB estéril + *Pseudomona aeruginosa*. 11: (C+): TSB estéril + gentamicina + *Pseudomona aeruginosa*. 12: (C+): TSB estéril + gentamicina + *Bacillus spizizenii*

Elaborador por: El Autor, 2018.

3.1.5. Análisis estadístico de la MIC

3.1.5.1. Porcentaje de inhibición de *Pseudomona aeruginosa* frente al antibiótico

En la tabla No.6 se presenta el ANOVA de los tratamientos de la concentración del antibiótico para la inhibición de *Pseudomona aeruginosa*, se obtuvo un resultado de p-valor <0.0001 con un estadístico de Fisher de 58.99, donde se afirma que al menos un tratamiento presenta diferencia significativa.

Tabla No. 6. ANOVA para los tratamientos de la inhibición de *Pseudomona aeruginosa*

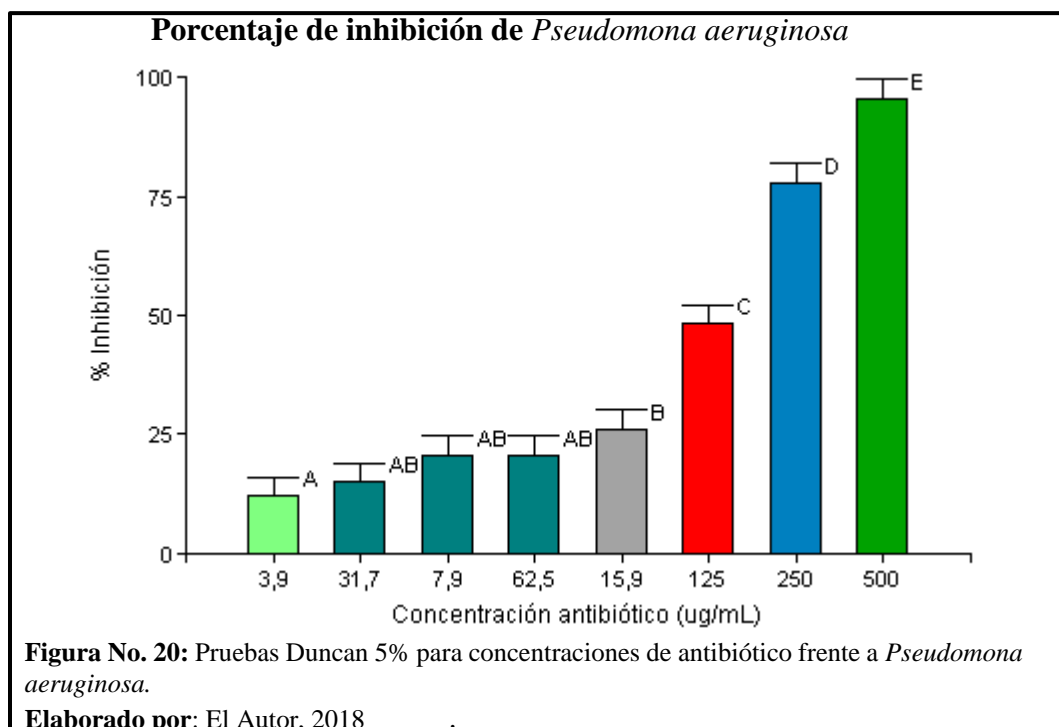
Análisis de varianza (SC tipo III)		
F. V	F	p-valor
Concentraciones	58.99	<0.0001

Nota: F: estadístico, P: probabilidad.

Elaborado por: El Autor, 2018.

3.2.5.1.1. Porcentaje de inhibición de *Pseudomona aeruginosa* frente al antibiótico por tratamiento, prueba Duncan 5 %

Mediante la prueba de Post Hoc de Duncan 5 %, se pudo identificar 6 rangos de significancia de las 8 concentraciones de antibióticos analizadas, y fueron: (A), (AB), (B), (C), (D) y (E). En la figura No.21 se interpreta con la letra “A” la concentración de 3.9 µg/mL produciendo una inhibición de la bacteria de 12.04 %, en el rango “AB” se encuentran las concentraciones 31.7 µg/mL, 7.9 µg/mL y 62.5 µg/mL sin diferencia significativa obteniendo un porcentaje de inhibición de 14.98 %; 20.50 % y 20.79 % respectivamente. En el rango “B” con una concentración de 15.9 µg/mL se obtuvo una inhibición de 25.97 %, dentro del rango “C” la concentración utilizada fue 125 µg/mL generando una inhibición bacteriana de 48.17 %, mientras que en el rango “D” con la concentración de 250 µg/mL se obtuvo una inhibición del 77.68 %. Por último, la mejor concentración de antibiótico fue del rango “E” obteniendo una alta inhibición del 95.58 % contra *Pseudomona aeruginosa* utilizando la concentración de 500 µg/mL.



3.1.5.2. Análisis del porcentaje de inhibición de *Bacillus spizizenii*

En la tabla No.7 se indica los resultados obtenidos del ANOVA para el porcentaje de inhibición de *Bacillus spizizenii*, se identificó un p-valor de <0.0001 con un Fisher de 35.81; indicando que al menos una concentración tiene diferencia significativa.

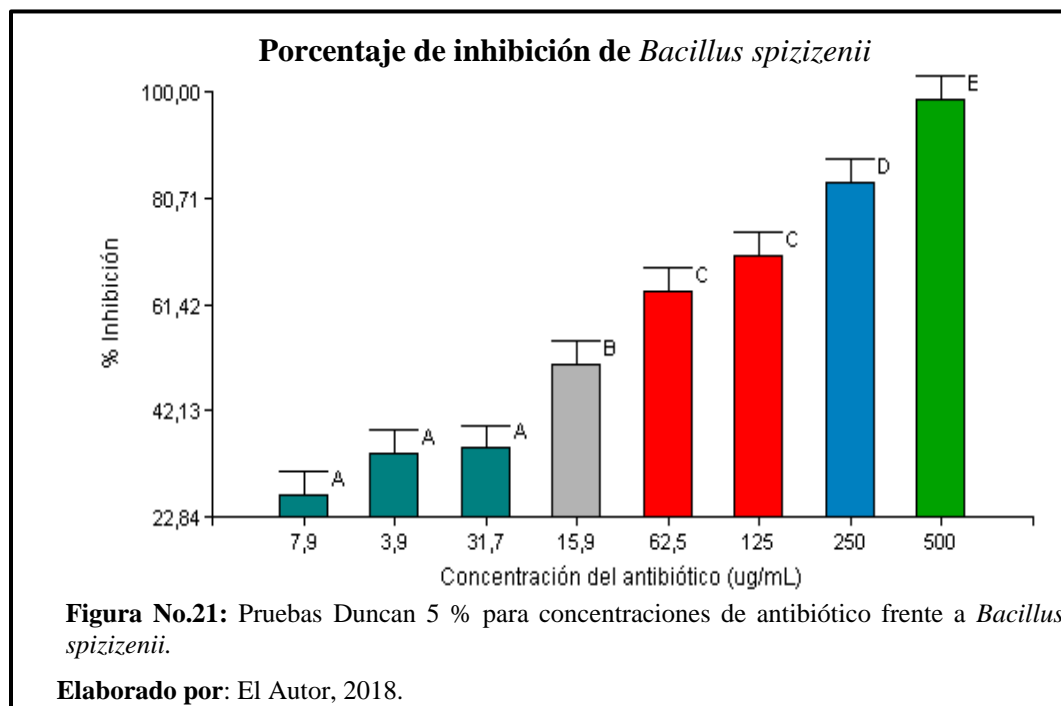
Tabla No.7: ANOVA para los tratamientos de la inhibición de *Bacillus spizizenii*.

Análisis de varianza (SC tipo III)		
F. V	F	p-valor
Concentraciones	35.81	<0.0001

Nota: F: estadístico; P: probabilidad.
Elaborado por: El Autor, 2018.

3.1.5.3. Porcentaje de inhibición de *Bacillus spizizenii* frente al antibiótico por tratamiento, prueba Duncan 5 %

Al realizar la prueba Post Hoc de Duncan 5 %, se pudieron diferenciar 5 rangos con diferencias significativas entre las 8 concentraciones analizadas. En la figura No.22 se observa que el rango “A” está conformado por 3 concentraciones 7.9 µg/mL, 3.9 µg/mL y 31.7 µg/mL obteniendo una inhibición 26.65 %, 34.21 % y 35.23 % respectivamente, en el caso del rango “B” con una concentración de 15.9 µg/mL se generó una inhibición del 50.62 %. El rango “C” conformado por 2 concentraciones 62.5 µg/mL y 125 µg/mL produjo una inhibición del 63.77 % y 70.37 % respectivamente, en el rango “D” utilizando la concentración de 250 µg/mL se obtuvo una inhibición del 83.51 %. En rango óptimo en este ensayo fue el “E” con la concentración de 500 µg/mL obteniendo un porcentaje alto de inhibición del 98.46 % de la bacteria *Bacillus spizizenii*.



3.1.5.4. Análisis estadístico del porcentaje de inhibición entre *Pseudomona aeruginosa* y *Bacillus spizizenii*.

En la tabla No.8 se describe los resultados del ANOVA de la inhibición de los microorganismos utilizados con las diferentes concentraciones de antibiótico. Se observó un Fisher de 77.04 y un p-valor de <0.0001, confirmando que existe diferencia significativa entre las dos cepas utilizadas en la MIC.

Tabla No.8. ANOVA de la inhibición de las cepas utilizadas en el ensayo.

Análisis de varianza (SC tipo III)		
F. V	F	p-valor
Cepas	77.04	<0.0001

Nota: F: estadístico; P: probabilidad.

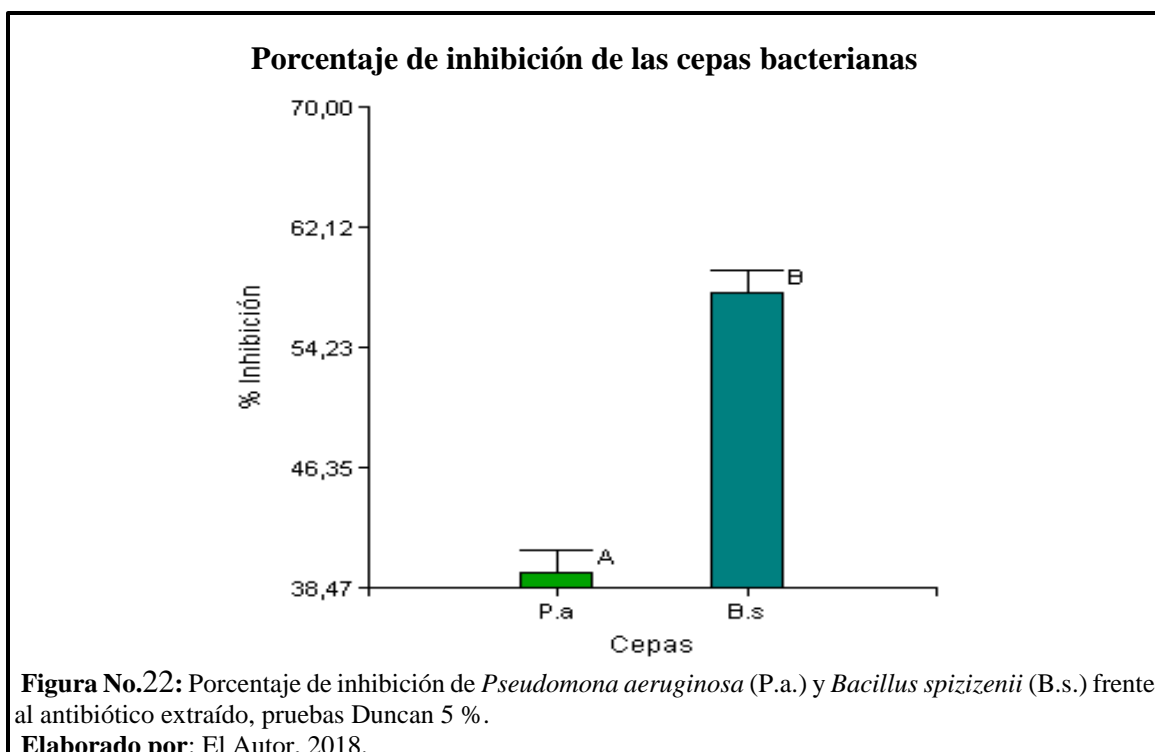
Elaborado por: El Autor, 2018

3.1.5.5. Análisis estadístico del porcentaje de inhibición entre *Pseudomona aeruginosa* y *Bacillus spizizenii* por tratamientos, prueba Duncan 5 %

En la figura No 23 se observa que al realizar la MIC utilizando el antibiótico extraído de *Bacillus megaterium* produjo mayor inhibición en *Bacillus spizizenii* (control para bacterias Gram positivos) ya que fue inhibida en un total del 57.85 % mientras que en el caso de *Pseudomona aeruginosa* (control para bacterias Gram negativos) se obtuvo una menor inhibición del 39.49 %.

La diferencia significativa de la sensibilidad microbiana a los agentes antimicrobianos se debe a la estructura celular que poseen las bacterias, Kaplan (2014) afirma que las bacterias Gram negativas tienen una característica distintiva a las bacterias Gram positivas que es la presencia de una membrana externa que rechaza el ingreso de ciertos antibióticos

a la célula; por tal motivo las bacterias Gram negativas son más resistentes a los antibióticos que las Gram positivas (Madigan, et al., 2009).



Conclusiones

Al realizar la producción del antibiótico en medio ISP2, se establece que este medio permite a la bacteria mejorar el rendimiento en la producción de moléculas antibióticas y al inocular el microorganismo *Bacillus megaterium* en caldo ISP2 en condiciones de estrés de 1.2 % de salinidad y un pH de 7 ± 0.2 se extrajo una mayor cantidad en el día 4 obteniendo 52.20 mg de antibiótico a partir de 2 litros de medio ISP2.

Al identificar los principales grupos funcionales del antibiótico extraído de 3 y 4 días, se pudo evidenciar que, en ambos tiempos de producción, el antibiótico contiene los mismos grupos funcionales tales como: amino, carbonilo, carboxilo, alcano y alcoxi. Confirmando que tanto el antibiótico que produce mayor inhibición en *Bacillus spizizenii* (3 días) como el antibiótico que genera mayor inhibición en *Pseudomona aeruginosa* (4 días) son idénticos. También se evidenció posibles estructuras químicas similares al grupo de antibióticos de los Beta-Lactámicos.

Al purificar el antibiótico mediante TLC se obtuvo una separación de 3 compuestos, en el cual mediante la bioautografía de inmersión en *Bacillus spizizenii* se visualizó un halo de inhibición de 7.3 mm de diámetro en el compuesto con $R_f = 0.61$; mientras que en *Pseudomona aeruginosa* se observó un halo de inhibición de 1.2 mm de diámetro en la molécula con $R_f = 0.61$.

Al evaluar la concentración mínima inhibitoria realizando la técnica de microdilución en caldo con *Bacillus spizizenii* se obtuvo mayor inhibición en la concentración de 500 µg/mL de antibiótico inhibiendo el 98.46 % de la cepa. En el caso de *Pseudomona aeruginosa* se produjo mayor inhibición en la concentración de 500 µg/mL inhibiendo el 95.58 % de la bacteria.

Mediante el análisis estadístico se confirma que el antibiótico genera un mayor porcentaje de inhibición contra *Bacillus spizizenii* en un total de 57.85 % mientras que para *Pseudomona aeruginosa* se inhibió un total de 39.49 %. Concluyendo que a pesar de ser un antibiótico extraído de amplio espectro tiene más eficacia contra *Bacillus spizizenii*, es decir contra bacterias Gram positivas.

Recomendaciones

Realizar la extracción del antibiótico con ayuda de otros solventes orgánicos como cloroformo, acetato de etilo, n- butanol, acetonitrilo, etc., teniendo en cuenta la precaución de no dañar la molécula antibiótica al extraer debido a los puntos altos de ebullición.

Realizar una cromatografía preparativa para identificar de forma detallada la estructura química de la molécula con propiedad antimicrobiana, encontrada en la bioautografía de inmersión; mediante análisis de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y un análisis de derivatización GC/MS.

Referencias

- Acosta, J., Rodríguez, I., & Nuevas, L. (2010). Separación de los componentes de la mezcla azeotrópica acetona–n-hexano mediante un proceso combinado: extracción líquido-líquido y destilación discontinua. *CENIC Ciencias Biológicas*, 37-42. Recuperado el 18 de Agosto de 2018, de <https://revista.cnic.edu.cu/revistaCQ/sites/default/files/articulos/CQ-2010-1-037-042.pdf>
- Action on Antibiotic Resistance (ReAct). (2014). *Uso apropiado de antibióticos y resistencia bacteriana*. Cuenca: Austro. Recuperado el 26 de Abril de 2018
- Anaya, A., Espinosa, F., & Cruz, R. (2001). *Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación*. México: P y V. Recuperado el 22 de Agosto de 2018
- Andayani, D., Sukandar, U., & Sukandar, E. (2016). Antibacterial, Antifungal and Anticancer Activity of Five Strains of Soil Microorganisms Isolated From Tangkuban Perahu Mountain by Fermentation. *HAYATI Journal of Biosciences*, 1-5. doi:10.1016/j.hjb.2016.01.003
- Arco, J. (2014). Antibióticos: situación actual. *Farmacia Profesional*, 29-33. Recuperado el 25 de Abril de 2018, de <http://www.elsevier.es>
- Aristil, P. (2010). *Farmacología básica y clínica* (5a ed.). México D.F.: McGrawHill. Recuperado el 23 de Abril de 2018

- Baindara, P., Korpole, S., & Chawla, N. (2013). Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample. *AMB Express*, 1-11. doi:10.1186/2191-0855-3-2
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibensouda, S. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 71-79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
- Bermejo, R., & Moreno, A. (2014). *Análisis instrumental*. Madrid: Síntesis. Recuperado el 21 de Mayo de 2018
- Bernice, F., & Regi, R. (2014). Optimization of antibiotic production by marine actinomycetes *Streptomyces* SP. KOD10. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 506-510. Recuperado el 18 de Agosto de 2018, de <https://innovareacademics.in/journal/ijpps/Vol6Suppl2/8490.pdf>
- Botz, L. (2013). BIOASSAYS | Bioautography. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, 1-18. doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.00035-4
- Bustamante, S. (2015). *Protocolo para la evaluación/comparación de la actividad antimicrobiana de antibióticos genéricos y antibióticos innovadores, frente a patógenos clínicos (Tesis de grado)*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. Recuperado el 30 de Abril de 2018, de <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/16662>
- Cabrerizo, D. M. (2016). *Cultura científica 4º ESO*. Editex. Recuperado el 23 de Abril de 2018

- Calderón, G., & Aguilar, L. (2016). Resistencia antimicrobiana: Microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica LXXIII*, 757-763. Recuperado el 26 de Abril de 2018, de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2016/rmc164c.pdf>
- Carlone, N., & Pompei, R. (2013). *Microbiología Farmacéutica*. Napoli: EdiSES. Recuperado el 21 de Julio de 2018
- Cela, R., Casais, M., & Lorenzo, R. (2002). *Técnicas de separación en Química Analítica*. Madrid: Sintesis. Recuperado el 13 de mayo de 2018
- Centers for Disease Control and Prevention. (2013). *Antibiotic resistance threats in the United States*. Washington: US Department of Health and Human Services. Recuperado el 27 de Mayo de 2018
- Chen, Y., Valle, A., & Valdebenit, N. (2014). *Mediciones y métodos de uso común en el laboratorio de Química*. Santiago de Chile: Universidad Católica de Chile. Recuperado el 25 de Agosto de 2018
- Choma, I. (2013). Antibiotics. En J. Sherma, *Handbook of Thin-Layer Chromatography* (págs. 417-441). New York: Marcel Dekker. Recuperado el 27 de Mayo de 2018
- Choma, I., & Grzelak, E. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2684–2691. doi:10.1016/j.chroma.2010.12.069
- Choma, I., & Jesionek, W. (2015). Effects Directed Biological. *Instrumental Thin-Layer Chromatography Detection: Bioautography*, 279-312. doi:10.1016/B978-0-12-417223-4.00011-X

- Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., & Bhattacharya, N. (2015). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 75–84. doi:10.1016/j.jpha.2014.06.002
- Egas, C., & Tinajero, M. (2016). *Aislamiento de microorganismos capaces de producir antibióticos, a partir de suelos de las regiones naturales de Ecuador (Tesis pregrado)*. Universidad Politécnica Salesiana, Quito. Recuperado el 12 de Febrero de 2018, de <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/12142>
- Fallas, J. (2012). *Análisis de varianza: Comparando tres o más medias*. Recuperado el 16 de Agosto de 2018, de <http://www.ucipfg.com>
- Fernández, R. (2016). *Bioquímica clínica: Principios y guías para el laboratorio*. La Habana: Ecimed. Recuperado el 2017 de Mayo de 2018
- Guarnizo, A., & Martinez, P. (2009). *Experimentos de Química Orgánica con enfoque en ciencias de la vida*. Armenia: ELIZCOM S.A.S. Recuperado el 21 de septiembre de 2018
- Guillamas, C., Gutiérrez, E., & Hernando, A. (2017). *Técnicas básicas de enfermería*. Editex. Recuperado el 23 de Abril de 2018
- Hernández, A. (2003). *Microbiología Industrial*. San José: EUNED. Recuperado el 30 de Abril de 2018
- Hernández, R. (6 de Noviembre de 2006). *Proteínas y Aminoácidos*. Recuperado el 22 de Agosto de 2018, de <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/proteinas/>
- Hussain, A., Rather, M., & Hassana, Q. (2018). *Streptomyces puniceus strain AS13., Production, characterization and evaluation of bioactive metabolites: A new face*

- of dinactin as an antitumor antibiotic. *Microbiological Research*, 196–202.
doi:10.1016/j.micres.2017.12.004
- Ivashchenk, O., Jurga, J., Coy, E., & Jurga, S. (2015). Fourier transform infrared and Raman spectroscopy studies on magnetite/Ag/antibiotic nanocomposites. *Applied Surface Science*, 1-30. doi:10.1016/j.apsusc.2015.12.149
- Kaplan, M. (1 de Enero de 2014). El problema con las bacterias gramnegativas. *Herp Care Collection*, pág. 1. Recuperado el 22 de Septiembre de 2018, de <http://www.anapsid.org/gramnegative.html>
- Komsta, L., Waksmundzka, M., & Sherma, J. (2014). *Thin Layer Chromatography in Drug Analysis*. New York: CRC PRESS. Recuperado el 25 de Agosto de 2018
- Larrea, I., & Falconí, C. (2015). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* spp. con actividad contra *Tetranychus urticae* Koch en cultivos comerciales de rosas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 140-148.
doi:10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54291
- López, E., & González, B. (2013). *Diseño y Análisis de Experimentos: Fundamentos y aplicaciones en Agronomía*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
Recuperado el 26 de Abril de 2018
- Madigan, M., Martinko, J., & Dunlap, P. (2009). *Brock, Biología de los microorganismos* (12a ed. ed.). Madrid, España: Pearson. Recuperado el 21 de Abril de 2018
- Malbrán, C. (2012). *Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución*. Argentina: Clinical and Laboratory Standards Institute. Recuperado el 19 de Febrero de 2018

- Marinelli, F., & Molinari, F. (2012). Las fermentaciones en la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico. En J. Sánchez, & F. Ortiz, *Monografía XXXV: Biocatálisis aplicada a la obtención de fármacos y productos de alto valor añadido* (págs. 61-104). Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia. Recuperado el 22 de Septiembre de 2018
- Móricz, Á., Kruzselyi, D., Béni, S., & Csontosd, P. (2017). Layer chromatography-bioassays directed screening and identification of antibacterial compounds from Scotch thistle. *Journal of Chromatography A*, 1-20. doi:10.1016/j.chroma.2017.09.062
- Muñoz, A. (2017). *Antibióticos en el suelo (Tesis pregrado)*. Universidad Complutense, Madrid. Recuperado el 12 de Febrero de 2018
- Najafpour, G. (2017). Production of Antibiotics. *Biochemical Engineering and Biotechnology*, 263-279. doi:10.1016/B978-044452845-2/50011-2
- Núñez, J., & Sierra, D. (2018). *Identificación de microorganismos de suelos de la provincia de Pichincha, con capacidad de producir antibióticos de amplio espectro (Tesis pregrado)*. Universidad Politécnica Salesiana, Quito. Recuperado el 2018 de Marzo de 27, de <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15186>
- Ostertagová, E., & Ostertag, O. (2013). Methodology and Application of One-way ANOVA. *American Journal of Mechanical Engineering*, 256-261. doi:10.12691/ajme-1-7-21

- Paredes, F., & Roca, J. (2004). Acción de los antibióticos. *O F F A R M*, 116-124.
Recuperado el 28 de Abril de 2018, de www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13059414-S300
- Posada, M. (2015). *Análisis bioquímico*. Madrid: Parainfo. Recuperado el 21 de Mayo de 2018
- Putkaradze, N., Litzenburger, M., & Bernhardt, R. (2017). CYP109E1 is a novel versatile statin and terpene oxidase from *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 8379–8393. doi:10.1007/s00253-017-8552-6)
- Quintana, A. (2002). Antibióticos. Bases Microbiológicas del uso de antimicrobianos. *CEFA*, 1-17. Recuperado el 23 de Abril de 2018, de www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2028.pdf
- Ramirez, L., & Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar In Vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 263-268. Recuperado el 26 de Mayo de 2018, de <http://www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf>
- Reyes, F., & Palou, E. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de componentes químicos de los aceites esenciales . *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos* , 68-78. Recuperado el 26 de Mayo de 2018
- Rivera, N., & Hansen, M. (2017). *Rediseño de la columna de extracción líquido - líquido y ensayo didáctico (Tesis grado)*. Universidad de Guayaquil, Guayaquil. Recuperado el 13 de Mayo de 2018, de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug>

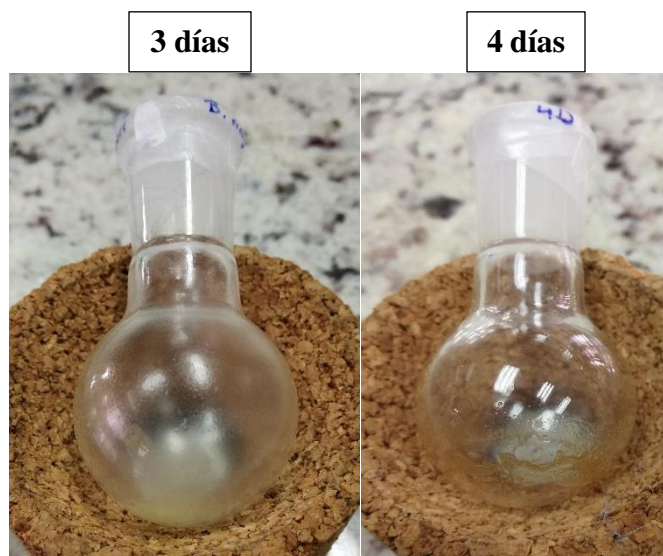
- Sadlej, N., Ocios, A., & Fuks, L. (2006). Selectivity of similar compounds' identification using IR spectrometry: b-Lactam antibiotics. *Journal of Molecular Structure*, 110–114. doi:10.1016/j.molstruc.2005.12.054
- Sánchez, E., Loruhamá, S., & García, P. (2016). Actividad antimicrobiana. *Investigación en plantas de importancia médica*, 77-100. doi:10.3926/oms.334
- Sánchez, M. (2010). *Comprobación de la actividad tintorera en fibras orgánicas y sintéticas de la Berberis hallii (tesis de pregrado)*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba. Recuperado el 13 de Febrero de 2018
- Scholle, M., White, C., & Vary, P. (2003). Sequencing and Characterization of pBM400 from *Bacillus megaterium* QM B1551. *Appl. Environ. Microbiol.*, 6888-6898. doi:10.1128/AEM.69.11.6888-6898.2003
- Sherma, J. (2013). Basic TLC Techniques, Materials, and Apparatus. En Joseph, *Handbook of Thin-Layer Chromatography* (págs. 1-61). New York: Marcel Dekker. Recuperado el 10 de Noviembre de 2018
- Shneine, J., & Al-Araji, Y. (2015). Chemistry of Formazan. *International Journal of research in Phamarcy and chemistry*, 41-76. Recuperado el 15 de Agosto de 2018
- Sierra, I., & Romero, M. (2012). Determinación de la actividad antimicrobiana e insecticida de extractos producidos por bacterias aisladas del suelo. *Actual Biol* 34, 5-19. Recuperado el 13 de Febrero de 2018, de <https://aprendeonline.udea.edu.co/revistas/index.php/actbio/article/view/14238/0>

- Silva, S., Vieira, J., Cavalcanti, E., & Araujo, J. (2016). Influence of glucose and stirring in the fermentation process in order to produce anti-Candida metabolites produced by *Streptomyces* sp. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 265-272. doi:10.1590/S1984-82502016000200004
- Skoog, D., & West, D. (2014). *Fundamentos de Química analítica* (9a ed.). México D.F.: Cengage Learning. Recuperado el 8 de Mayo de 2018
- Talero, V., & Medina, O. (2014). Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. *Journal of the Faculty of Sciences*, 11-29. doi:10.11144/Javeriana.SC19-1.taci
- Tortoló, K., & Bell, A. (2015). Producción de proteínas recombinantes en *Bacillus megaterium*: estado del arte. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, 22-26. Recuperado el 21 de Abril de 2018, de <http://www.redalyc.org/pdf/2231/223136961004.pdf>
- Uzaira, B., Menaa, F., & Menaa, B. (2017). Isolation, purification, structural elucidation and antimicrobial activities of kocumarin, a novel antibiotic isolated from actinobacterium *Kocuria marina* CMG S2 associated with the brown seaweed *Pelvetia canaliculata*. *Microbiological Research*, 1-32. doi:doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.007
- Uzcátegu, M., & Serrano, J. (2013). Condiciones de cultivo que fomentan la producción de sustancias antimicrobianas en actinomicetos patógenos y del suelo. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 134-139. Recuperado el 13 de Febrero de 2018, de <http://www.scielo.org.ve/scielo>

- Volontè, M., & Quiroga, P. (2013). *Análisis farmacéutico*. La plata: Edulp. Recuperado el 27 de Mayo de 2018
- Williams, J., Sallach, B., Bartelt-Hunt, S., & Durso, L. (2016). Antibiotics and Antibiotic Resistance in Agroecosystems: State of the Science. *Journal of Environmental Quality*, 395-406. doi:10.2134/jeq2015.07.0336
- You, L.-X., Liu, L.-D., & Zhao, F. (2018). Flavins mediate extracellular electron transfer in Gram-positive *Bacillus megaterium* strain LLD-1. *Bioelectrochemistry*, 196–202. doi:10.1016/j.bioelechem.2017.10.005

Anexos

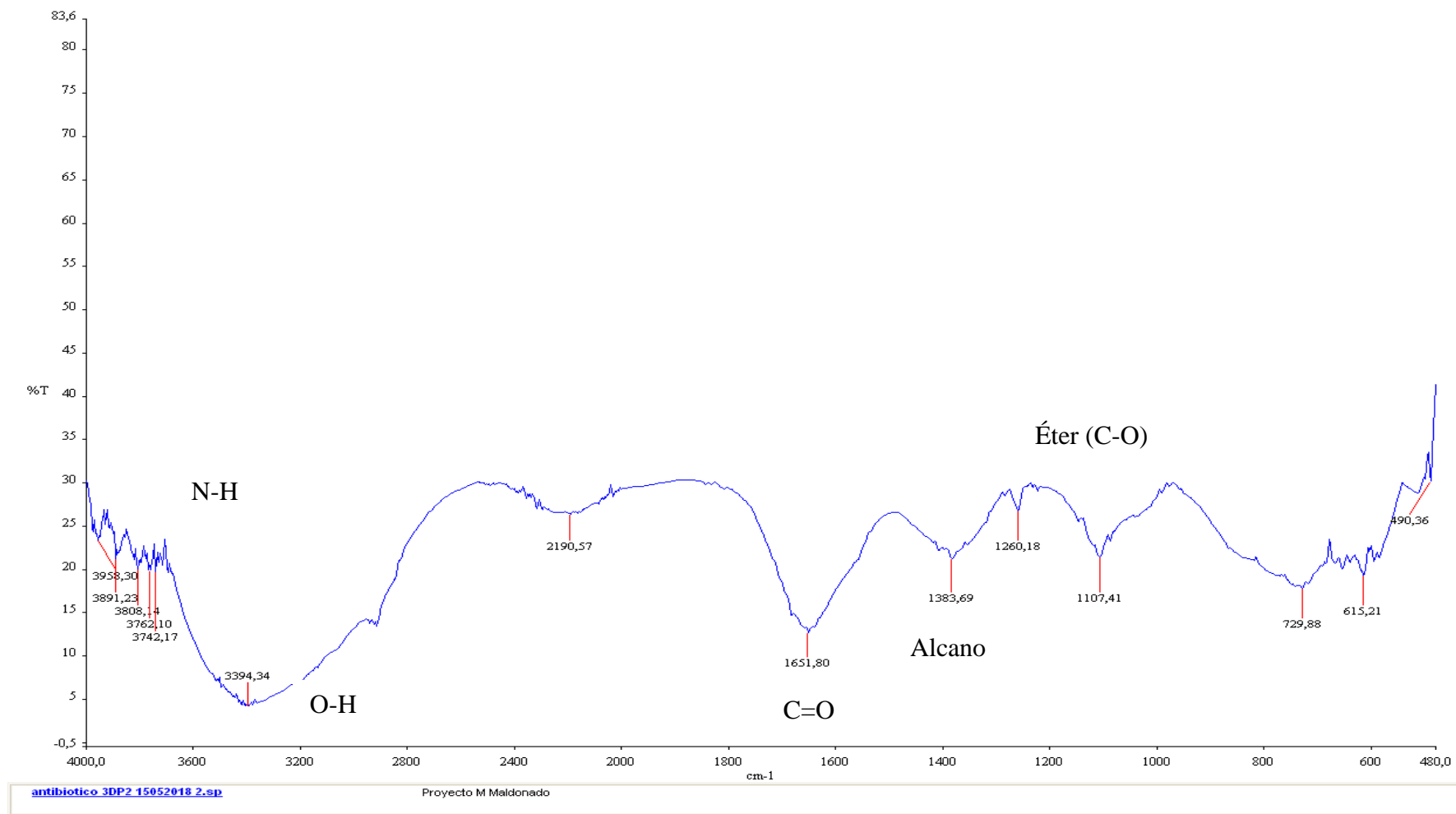
Anexo No.1. Antibiótico producido por *Bacillus megaterium* en medio ISP2 y extraído con hexano, en un tiempo de producción de 3 días y de 4 días.



Elaborado por: El autor, 2018.

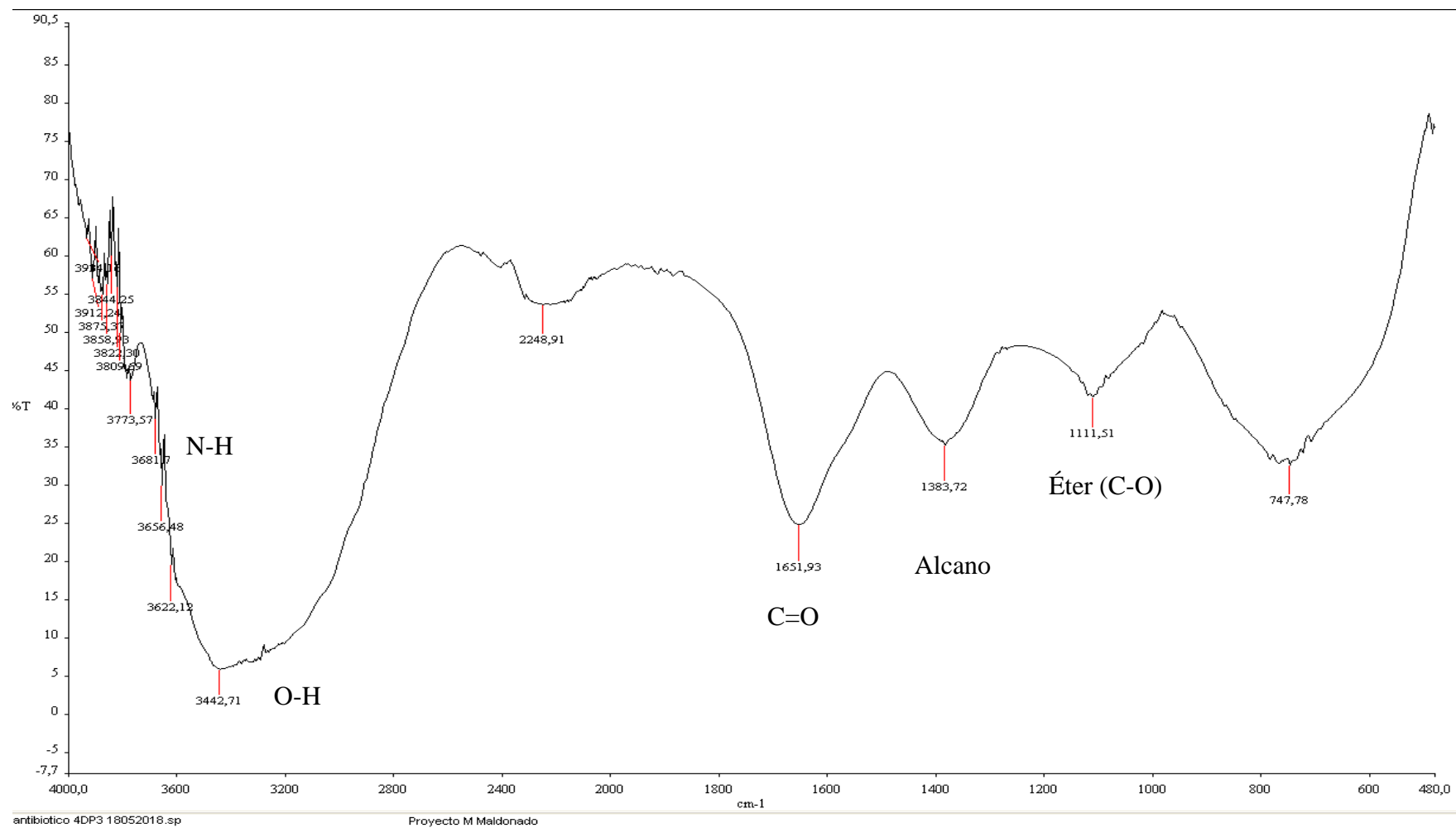
Anexo No. 2. Espectros Infrarrojos del Antibiótico purificado

Tiempo: 3 días



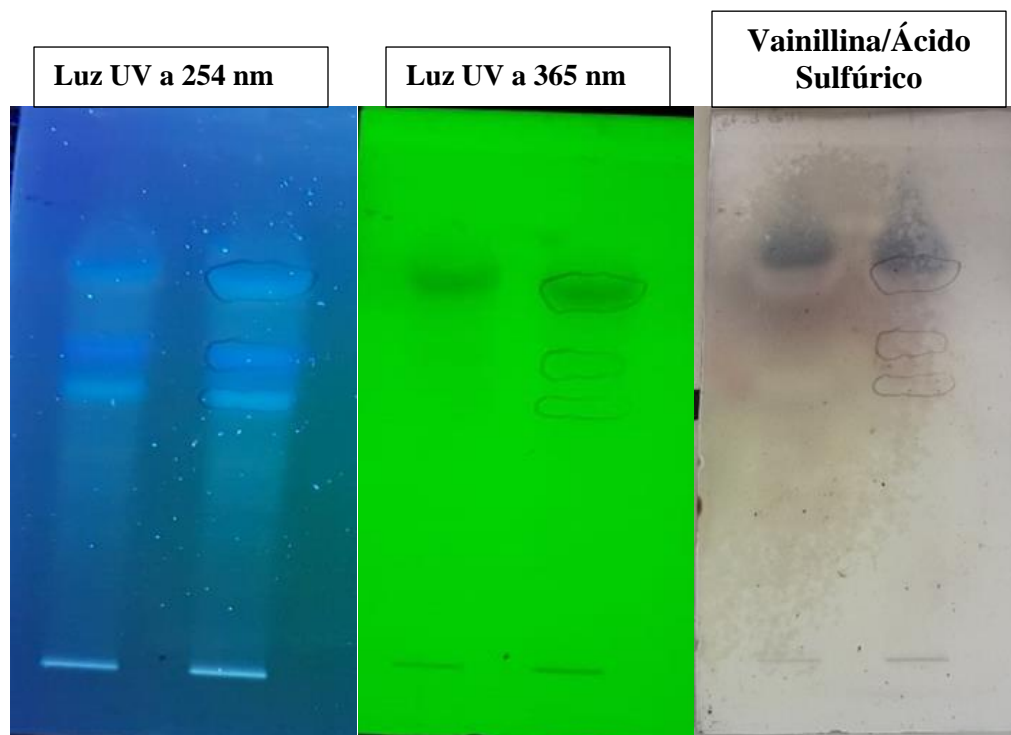
Elaborado por: El autor, 2018.

Tiempo: 4 días.



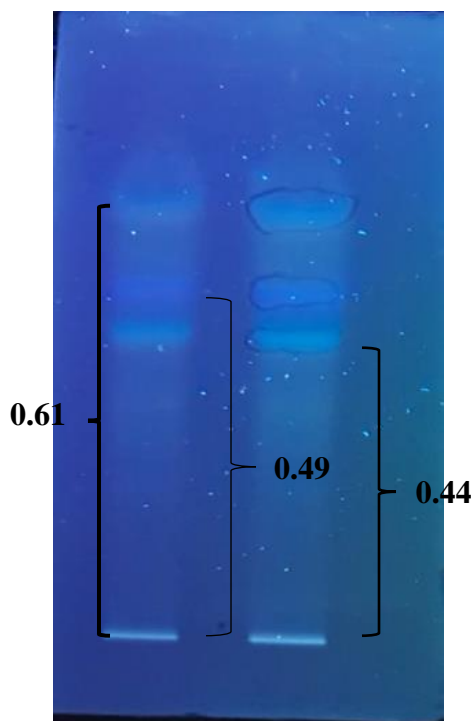
Elaborado por: El autor, 2018.

Anexo No. 3. Cromatografía TLC utilizando antibiótico a una concentración de 10 mg/mL observadas bajo luz UV a 254 nm (absorbancia), a 365 nm (fluorescencia) y con revelador de vainillina/Ácido Sulfúrico.



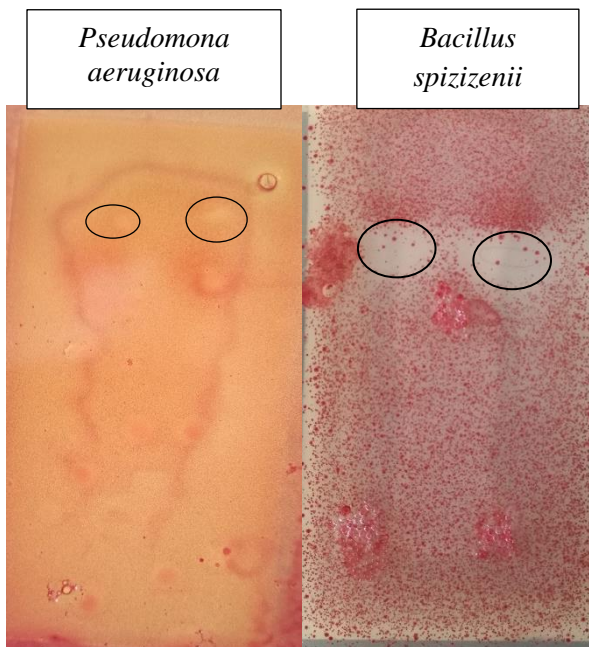
Elaborador por: El autor, 2018.

Anexo No.4. Medición de los *R_f* de las moléculas obtenidas en la separación mediante TLC.



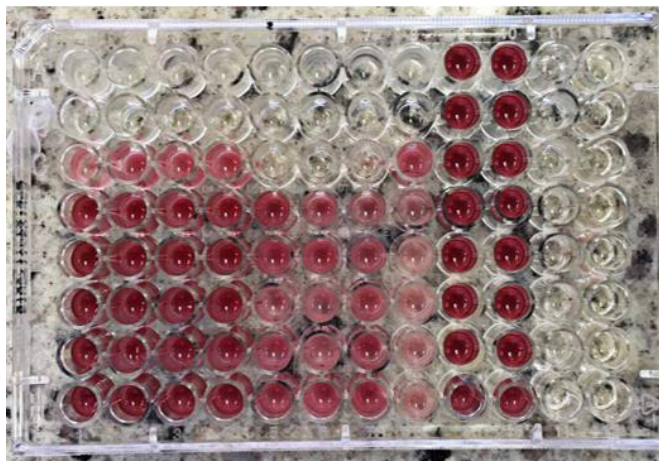
Elaborador por: El autor, 2018.

Anexo No. 5. Bioautografía del antibiótico utilizado en una concentración de 10 mg/mL contra *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027) y *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633).



Elaborador por: El autor, 2018.

Anexo No. 6. Microdilución en caldo para evaluar la Concentración Mínima Inhibitoria.



Elaborador por: El autor, 2018